

. - 16PH

AP/1634

PTO/SB/21 (03-03)

Approved for use through 04/30/2003. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

TRANSMITTAL FORM (to be used for all correspondence after initial filing)	Application Number	ART-00101.P.1	
	Filing Date	Aug 25, 2000	
	First Named Inventor	Wang	
	Art Unit	1634	
	Examiner Name	Lu, Frank Wei Min	
Total Number of Pages in This Submission	2	Attorney Docket Number	ART-00101.P.1

ENCLOSURES (Check all that apply)		
<input checked="" type="checkbox"/> Fee Transmittal Form	<input type="checkbox"/> Drawing(s)	<input type="checkbox"/> After Allowance Communication to a Technology Center (TC)
<input type="checkbox"/> Fee Attached	<input type="checkbox"/> Licensing-related Papers	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences
<input type="checkbox"/> Amendment/Reply	<input type="checkbox"/> Petition	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to TC (Appeal Notice, Brief, Reply Brief)
<input type="checkbox"/> After Final	<input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application	<input type="checkbox"/> Proprietary Information
<input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s)	<input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address	<input type="checkbox"/> Status Letter
<input type="checkbox"/> Extension of Time Request	<input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer	<input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below):
<input type="checkbox"/> Express Abandonment Request	<input type="checkbox"/> Request for Refund	
<input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement	<input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____	
<input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s)	Remarks	
<input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/Incomplete Application	1. Submission of Certified Copy of Priority Document;	
<input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53	2. Postcard	

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT

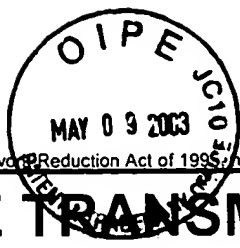
Firm or Individual	David R. Preston Reg. No. 38,710
Signature	
Date	May 5, 2003

CERTIFICATE OF TRANSMISSION/MAILING

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to the USPTO or deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 on this date: MAY 5, 2003	
Typed or printed	Raymond Wagenknecht
Signature	
Date	5/5/2003

This collection of information is required by 37 CFR 1.5. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.**

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 (1-800-786-9199) and select option 2.



PTO/SB/17 (01-03)

Approved for use through 04/30/2003. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

FEE TRANSMITTAL

for FY 2003

Effective 01/01/2003. Patent fees are subject to annual revision.

☒ Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27

TOTAL AMOUNT OF PAYMENT (\$) 0.00

Complete if Known

Application Number	09/648,081
Filing Date	Aug 25, 2000
First Named Inventor	Wang
Examiner Name	LU, Frank Wei Min
Art Unit	1634
Attorney Docket No.	ART-00101.P.1

METHOD OF PAYMENT (check all that apply)☐ Check ☐ Credit card ☐ Money Order ☐ Other ☐ None☒ Deposit Account:Deposit
Account
Number
Deposit
Account
Name

501321

David R. Preston

The Commissioner is authorized to: (check all that apply)

☐ Charge fee(s) indicated below ☒ Credit any overpayments☒ Charge any additional fee(s) during the pendency of this application☐ Charge fee(s) indicated below, except for the filing fee to the above-identified deposit account.**FEE CALCULATION****1. BASIC FILING FEE**

Large Entity		Small Entity		Fee Description	Fee Paid
Fee Code	Fee (\$)	Fee Code	Fee (\$)		
1001	750	2001	375	Utility filing fee	
1002	330	2002	165	Design filing fee	
1003	520	2003	260	Plant filing fee	
1004	750	2004	375	Reissue filing fee	
1005	160	2005	80	Provisional filing fee	
SUBTOTAL (1)					(\$) 0.00

2. EXTRA CLAIM FEES FOR UTILITY AND REISSUE

Total Claims		Extra Claims		Fee from below		Fee Paid	
Independent Claims		-20** =		X			
Multiple Dependent		-3** =		X			

Large Entity		Small Entity		Fee Description	Fee Paid
Fee Code	Fee (\$)	Fee Code	Fee (\$)		
1202	18	2202	9	Claims in excess of 20	
1201	84	2201	42	Independent claims in excess of 3	
1203	280	2203	140	Multiple dependent claim, if not paid	
1204	84	2204	42	** Reissue independent claims over original patent	
1205	18	2205	9	** Reissue claims in excess of 20 and over original patent	
SUBTOTAL (2)					(\$) 0.00

**or number previously paid, if greater; For Reissues, see above

FEE CALCULATION (continued)**3. ADDITIONAL FEES**

Large Entity Small Entity

Fee Code	Fee (\$)	Fee Code	Fee (\$)	Fee Description	Fee Paid
1051	130	2051	65	Surcharge - late filing fee or oath	
1052	50	2052	25	Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	
1053	130	1053	130	Non-English specification	
1812	2,520	1812	2,520	For filing a request for <i>ex parte</i> reexamination	
1804	920*	1804	920*	Requesting publication of SIR prior to Examiner action	
1805	1,840*	1805	1,840*	Requesting publication of SIR after Examiner action	
1251	110	2251	55	Extension for reply within first month	
1252	410	2252	205	Extension for reply within second month	
1253	930	2253	465	Extension for reply within third month	
1254	1,450	2254	725	Extension for reply within fourth month	
1255	1,970	2255	985	Extension for reply within fifth month	
1401	320	2401	160	Notice of Appeal	
1402	320	2402	160	Filing a brief in support of an appeal	
1403	280	2403	140	Request for oral hearing	
1451	1,510	1451	1,510	Petition to institute a public use proceeding	
1452	110	2452	55	Petition to revive - unavoidable	
1453	1,300	2453	650	Petition to revive - unintentional	
1501	1,300	2501	650	Utility issue fee (or reissue)	
1502	470	2502	235	Design issue fee	
1503	630	2503	315	Plant issue fee	
1460	130	1460	130	Petitions to the Commissioner	
1807	50	1807	50	Processing fee under 37 CFR 1.17(q)	
1806	180	1806	180	Submission of Information Disclosure Stmt	
8021	40	8021	40	Recording each patent assignment per property (times number of properties)	
1809	750	2809	375	Filing a submission after final rejection (37 CFR 1.129(a))	
1810	750	2810	375	For each additional invention to be examined (37 CFR 1.129(b))	
1801	750	2801	375	Request for Continued Examination (RCE)	
1802	900	1802	900	Request for expedited examination of a design application	

Other fee (specify)

*Reduced by Basic Filing Fee Paid

SUBTOTAL (3) (\$) 0.00

SUBMITTED BY

Name (Print/Type)	David R Preston	Registration No. (Attorney/Agent)	38,710	Telephone	858-724-0375
Signature		Date	5/5/03		

WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

This collection of information is required by 37 CFR 1.17 and 1.27. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 (1-800-786-9199) and select option 2.



Patent

Docket Number: ART-00101.P.1

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:)	
)	
Wang et al.)	Examiner: LU, Frank Wei Min
)	
Application No.: 09/648,081)	Art Unit: 1634
)	
Filed: Aug 25, 2000)	
)	
For: METHODS AND COMPOSITIONS)	
FOR IDENTIFYING NUCLEIC)	
ACID MOLECULES USING)	
NUCLEOLYTIC ACTIVITIES AND)	
HYBRIDIZATION)	
)	

Assistant Commissioner for Patents
Washington D.C. 20231

Sir:

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Applicants respectfully submit herewith a certified copy of People's Republic of China priority document no. CN 00 1 23633.4 filed on August 24, 2000 naming Guoqing WANG et al. as inventors. Priority was claimed to this foreign document under 35 U.S.C. 119 (a)-(d) through the Paris Convention.

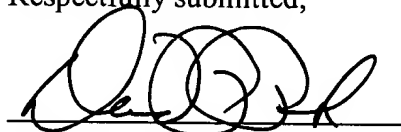
The above referenced U.S. patent application was filed before November 29, 2000 thus the sixteen (16) month time requirement under 37 C.F.R. § 1.55 does not apply to the present application. The enclosed Priority document is being submitted prior to payment of the issue fee. No fee is deemed necessary.

It is respectfully requested that the attached postcard be stamped and returned as soon as possible.

Please apply any charges not covered, or any credits, to **Deposit Account 501321** in the name of **David R. Preston & Associates** having **Customer No.: 24232**.

Date: May 5, 2003

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'D. Preston', written over a horizontal line.

David R. Preston
Reg. No. 38,710

David R. Preston & Associates, A.P.C.
12625 High Bluff Drive
Suite 205
San Diego, CA 92130

Telephone: 858.724.0375
Facsimile: 858.724.0384



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2000 08 24

申 请 号： 00 1 23633.4

申 请 类 别： 发明专利

发明创造名称： 用核酸酶解活性和杂交技术鉴别核酸分子的方法和组合物

申 请 人： 清华大学；腾隆科技公司

发明人或设计人：王国青；程京；吴镭；王小波；杨卫平

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2001 年 7 月 23 日



✓

权 利 要 求 书

1. 一种用于鉴定一种或多种核酸分子的方法，包括：

a) 在促进核酸分子之间发生杂交的条件下，至少一种核酸探针分子与待测群体的核酸分子发生接触并形成探针-待测群体的核酸分子混合物；

b) 用核酸酶解活性物处理所述探针-待测群体的核酸分子混合物，这样对核酸酶解敏感的核酸分子被酶解，由此生成核酸酶解活性保护的核酸分子群体；

c) 在促进核酸分子之间发生杂交的条件下，将所述核酸酶解活性保护的核酸分子群体与具有一个或多个附着核酸分子的固体载体相接触以形成附着核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物；和

d) 从一个或多个附着核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物中鉴定一个或多个所述的附着核酸分子或一个或多个核酸酶解活性保护的核酸分子。

2. 权利要求 1 中所述的方法，进一步说明包括将所述的核酸酶解活性保护的核酸分子群体暴露于促进在核酸酶解活性保护的核酸分子中形成单链核酸分子的条件。

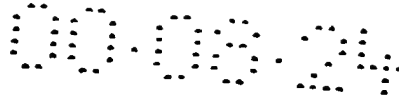
3. 权利要求 1 中所述的方法，其中所述的至少一种核酸探针分子至少部分是单链的。

4. 权利要求 1 中所述的方法，其中所述的至少一种核酸探针分子包括一个或多个核酸酶解活性抗性键。

5. 权利要求 1 中所述的方法，其中所述的至少一种核酸探针分子包括至少一种可检测标记。

6. 权利要求 5 中所述的方法，其中所述的至少一种可检测标记包括放射性同位素、荧光染料或特异结合成分。

7. 权利要求 5 中所述的方法，其中所述的至少一种可检测标记不包括质量修饰的核苷酸。



8. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种核酸探针分子的长度是介于 10 到 100 个核苷酸。

9. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种核酸探针分子含有一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变。

10. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种核酸探针的序列是终止于或接近一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变区。

11. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种核酸探针分子对所述的附着核酸分子来说是至少部分互补的或至少部分的基本互补。

12. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种核酸探针分子对所述的附着的核酸分子来说具有至少部分相同性或至少部分基本相同性。

13. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的待测群体包括 RNA。

14. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的待测群体包括 DNA。

15. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子是至少部分单链。

16. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子包括至少一种抗核酸酶解活性的键。

17. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子包括至少一种可检测标记。

18. 权利要求 17 中所述的方法, 其中所述的至少一种可检测标记包括放射性同位素、荧光染料或特异结合成分。

19. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子长度是介于 10 到 100 个核苷酸。

20. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子含有一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变。



6

21. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子包含终止于或接近一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变区的核酸序列。

22. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种附着的核酸分子对所述的核酸探针分子来说是至少部分互补的或至少部分的基本互补。

23. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一种固定的核酸分子对所述的核酸探针分子来说具有至少部分的相同性或至少部分基本相同性。

24. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的固体载体是一个 DNA 芯片或阵列。

25. 权利要求 24 中所述的方法, 其中所述的芯片或阵列材料可以是硝化纤维, 尼龙, 硅, 玻璃, 至少一种塑料、至少一种陶瓷材料或至少一种金属。

26. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的固体载体还包括微粒或珠。

27. 权利要求 26 中所述的方法, 其中所述的微粒或珠是顺磁性的。

28. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的固体载体是皿或平板。

29. 权利要求 28 中所述的方法, 其中所述的皿或平板包括玻璃, 聚苯乙烯, 聚碳酸酯, 聚氯乙烯或聚丙烯。

30. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的固体载体包括一个圆柱基质。

31. 权利要求 30 中所述的方法, 其中所述的圆柱基质包括琼脂糖, 纤维素, 丙烯酰胺, 右旋糖或磁性微粒。

32. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的核酸酶解活性包括核酸酶。

33. 权利要求 32 中所述的方法, 其中所述的核酸酶是单链特异性核酸酶。

34. 权利要求 33 中所述的方法, 其中所述的单链特异性核酸酶是绿豆核酸酶, S1 核酸酶, RNA 酶 H, 或 RNA 酶 T1 中的一种或多种。

35. 权利要求 1 中所述的方法, 进一步还包括核酸酶解活性保护的核酸分子的扩增。

36. 权利要求 35 中所述的方法, 其中所述的扩增基本上是线性的。

37. 权利要求 36 中所述的方法, 其中所述的扩增采用 DNA 聚合酶 I, Klenow 片段, T aquaticus 聚合酶, T4 DNA 聚合酶, SP6 RNA 聚合酶, 或 T7 RNA 聚合酶。

38. 权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的鉴定包括用至少一个可检测标记标记所述的附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物。

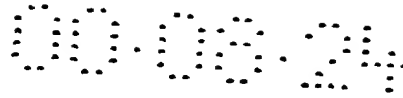
39. 权利要求 38 中所述的方法, 其中对所述的附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物的所述标记使用至少一种聚合酶。

40. 权利要求 39 中所述的方法, 其中所述的至少一种聚合酶是 T4 DNA 聚合酶, T. aquaticus 聚合酶, Klenow 片段, DNA 聚合酶 I, T7 RNA 聚合酶和 SP6 RNA 聚合酶中的一种。

41. 权利要求 38 中所述的方法, 其中所述的至少一种可检测标记包括放射性同位素, 荧光染料, 酶或特异结合成分。

42. 权利要求 38 中所述的方法, 其中所述的至少一个可检测标记包括至少一个核苷酸。

43. 权利要求 38 中所述的方法, 其中所述的至少一种可检测标记包括至少两种不同的核苷酸。



Y

44. 一种用于鉴定一个或多个核酸分子的方法，包括：

a) 在促进互补的核酸分子之间发生杂交的条件下，将至少一种核酸探针分子与待测群体的核酸分子接触并形成核酸分子混合物；

b) 用将核酸酶解活性物处理所述核酸分子混合物，这样对核酸酶解敏感的核酸分子被酶解，由此生成核酸酶解活性保护的核酸分子群体；

c) 将所述核酸酶解活性保护的核酸分子群体与具有一个或多个附着的核酸分子的固体载体相接触并形成附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物；

d) 用将核酸酶解活性物处理所述附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物，这样核酸分子的单链区域被切除；和

e) 鉴定在固体载体上结合一或多个所述的附着核酸分子。

45. 权利要求 44 中所述的方法，进一步包括将所述的核酸酶解活性保护的核酸分子群体暴露于促进在核酸酶解活性保护的核酸分子中的单链核酸分子的形成的条件下。

46. 权利要求 44 中所述的方法，其中所述的至少一个附着的核酸分子包括一个可检测标记。

47. 权利要求 46 中所述的方法，可检测标记包括放射性同位素，荧光染料，酶或特异结合成分。

48. 权利要求 44 中所述的方法，其中所述的至少一种附着的核酸分子含有一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变。

49. 权利要求 44 中所述的方法，其中所述的至少一种核酸探针包括终止于或接近一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变区的序列。

50. 权利要求 44 中所述的方法，其中所述的核酸酶解活性包括化学品或核酸酶。



51. 权利要求 50 中所述的方法，其中所述的核酸酶解活性包括核酸酶。

52. 权利要求 51 中所述的方法，其中所述的核酸酶包括绿豆核酸酶，S1 核酸酶，RNA 酶 H，或 RNA 酶 T1。

53. 一种用于鉴定一个或多个核酸分子的方法，包括：

a) 在促进核酸分子之间发生杂交的条件下，第一类核酸探针分子与第一类待测群体的核酸分子相接触并形成第一类探针-待测群体核酸分子的混合物；

b) 在促进核酸分子之间发生杂交的条件下，第二类核酸探针分子与第二类待测群体的核酸分子相接触并形成第二类探针-待测群体核酸分子的混合物；

c) 用核酸酶解活性物处理第一类和第二类探针-待测群体的核酸分子混合物，这样对核酸酶解敏感的核酸分子被酶解，从而产生两个核酸酶解活性保护的核酸分子群体；

d) 将两个核酸酶解活性保护的核酸分子群体与具有一个或多个附着的核酸分子的固体载体相接触并形成附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物；

e) 从一个或多个附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子复合物中鉴定一个或多个与一个或两个核酸酶解活性保护的核酸分子群体中的一个或多个分子结合的附着的核酸分子。

54. 权利要求 53 中所述的方法，进一步包括将所述的两个核酸酶解活性保护的核酸分子群体中的至少一个群体暴露于促进在核酸酶解活性保护的核酸分子中的单链核酸分子的形成的条件下。

55. 权利要求 53 中所述的方法，其中所述的第一类探针至少标记一种可检测标记，第二类探针也至少标记一个可检测标记。



56. 权利要求 53 中所述的方法，其中所述的第一类探针至少标记第一种可检测标记，第二类探针也至少标记第二个可检测标记，这两种可检测标记是不同的。

57. 权利要求 1 中所述的方法，进一步包括将至少一种信号核酸分子与附着的核酸分子/核酸酶解活性保护的核酸分子接触。

58. 权利要求 57 中所述的方法，其中所述的至少一种信号核酸分子是至少部分单链的。

59. 权利要求 58 中所述的方法，其中所述的至少一种信号核酸分子至少部分互补于至少一个所述的核酸探针分子。

60. 权利要求 57 中所述的方法，其中所述的至少一种信号核酸分子至少部分互补于已知的或预期的存在于待测核酸分子群体中的至少一种核酸分子。

61. 权利要求 57 中所述的方法，其中所述的至少一种信号核酸分子包含至少一个可检测的标记。

62. 权利要求 61 中所述的方法，其中所述的至少一种可检测标记包括放射性同位素，荧光染料或是特异结合成分。

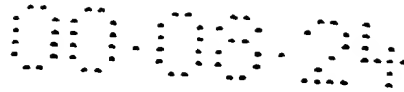
63. 权利要求 57 中所述的方法，其中所述的至少一种信号核酸分子的长度介于 10 个核苷酸到 200 个核苷酸。

64. 一种组合物，包括：

a) 一个固体载体，包括固定在它上面的至少两个附着的核酸分子的第一群体；

b) 不结合固体载体的至少两个核酸分子的第二群体，其中第一群体中大多数的附着核酸分子与第二群体中的一个或多个核酸探针分子至少是部分互补的。

65. 权利要求 64 中所述的组合物，其中所述的第一群体中的附着的核酸分子是至少部分单链的。



66. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第一群体中的附着的核酸分子的长度介于 10 个核苷酸到 100 个核苷酸。

67. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第一群体中的附着的核酸分子包含一个可检测标记。

68. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第二群体中的核酸分子是至少部分单链的。

69. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第二群体中的核酸分子的长度介于 10 个核苷酸到 100 个核苷酸。

70. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第二群体中的至少一个核酸分子包括一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变。

71. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第二群体中的至少一个核酸分子包含终止于或接近一个已知的或预期的单核苷酸多态性或突变区的核酸序列。

72. 权利要求 64 中所述的组合物, 进一步还包括核酸酶。

73. 权利要求 72 中所述的组合物, 其中所述的核酸酶是单链特异性核酸酶。

74. 权利要求 73 中所述的组合物, 其中所述的单链特异性核酸酶是 S1 核酸酶, 绿豆核酸酶, RNA 酶 H, 或 RNA 酶 T1 中的一种。

75. 权利要求 64 中所述的组合物, 进一步还包括聚合酶。

76. 权利要求 75 中所述的组合物, 其中所述的聚合酶是 Klenow 片段, DNA 聚合酶 I, *T. aquaticus* 聚合酶, 或反转录酶中的一种。

77. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第二群体中的核酸分子包含一个可检测标记。

78. 权利要求 77 中所述的组合物, 其中可检测的标记包括荧光染料。

79. 权利要求 64 中所述的组合物, 其中所述的第一群体中的附着的核酸分子包含一个可检测标记。

00-08-24

80. 权利要求 79 中所述的组合物，其中可检测的标记包括荧光染料。

81. 权利要求 64 中所述的组合物，进一步还包括缓冲液和试剂。

说明书

用核酸酶解活性和杂交技术鉴别核酸分子的方法和组合物

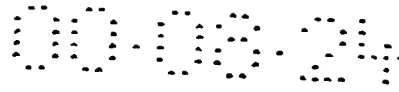
本发明是关于用核酸杂交技术鉴别核酸分子的，更明确的说，是关于用核酸酶解活性，选择与感兴趣序列互补的核酸分子，并通过核酸杂交技术鉴别。

根据序列鉴别核酸的方法在基因表达和调控、流行病学和公众健康、疾病诊断和预测、遗传决断（如亲子鉴定）和司法鉴定的研究中十分重要。核酸分子单链能和与之互补的另一单链发生特异杂交的特性使得从组成复杂、数量众多的核酸分子群体中捕获感兴趣的核酸分子成为可能。对于复杂的核酸分子群体，例如组成人类基因组的 DNA 分子群体或在一定的条件下（如患病阶段）在同一细胞中表达的 RNA 分子群体，这种捕获方法可以从中鉴别和/或纯化感兴趣的核酸分子。

通过电泳、转膜再和带标记的探针杂交（Northern blots: Northern 印迹法）来分析表达的 RNA 转录物，可以得到定量的基因表达数据。但是，这种分析方法耗时又耗力，灵敏度相对较低，用于分析大量基因的表达状况显然是不现实的。检测某个基因表达状况需要将膜与该基因对应的探针杂交，需要把旧的探针从膜上洗脱下来，然后和新探针杂交，再洗膜，进行放射自显影检测。

RNA 酶保护分析法可以提高检测的灵敏度，增加了数据的可信度，而且可以在一个杂交反应中分析多重 RNA 转录物。但是，一个反应中可被分析的基因数目相对较低，且需要进行凝胶电泳和放射自显影操作，这两种手段都费时费力。

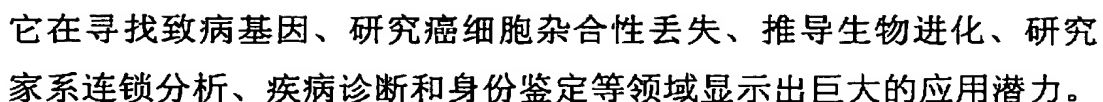
核酸芯片或阵列可以同时鉴别大量的核酸分子（参考文献：Debouck and Goodfellow (1999) Nature Genetics Suppl., 21: 48-50; Duggan, et al. (1999) Nature Genetics Suppl., 21: 10-14; Gerhold et



al.(1999) Trends Biochem Sci. 24: 168-173; Alizadeh et al., Nature 403: 503-5110)。用基因芯片或阵列进行基因表达研究，可以快速鉴别出在给定条件下的表达的基因。一个典型的例子是，通过 RNA 反转录所得 cDNA 和带有正常样品相应基因序列的 DNA 阵列进行杂交。CDNA 的标记是通过在合成过程中掺入带有标记的核苷酸实现的（参考文献：Schena et al. (1995) Science 270: 467-470），或使用带有标记的引物进行合成（U. S. Patent No. 6, 004, 755 issued December 21, 1999 to Wang）。但是，不同的 RNA 转录物的反转录效率是不一样的，这样的标记方法可能会造成比较大的差异。相对于原始 RNA 浓度，反转录效率的差异会导致 cDNA 和其对应的 RNA 相比，发生过量表达或不足表达。另外一个难点是从 RNA 反转录合成的 cDNA 与固定在载体表面的核酸杂交的效率因它们长度的不同而产生差异。这样就很难获得准确的基因表达水平的数据。这在两个 RNA 群体的比较中是一个尤为突出的问题。现在要通过对这两个群体中特定基因表达状况的比较进行标准化。

突变即在标准野生型基因组序列上发生了变化。突变可以是序列的缺失、序列的插入，或是在基因组的某一位置发生重组，也可以是基因组某个位置的单个碱基被置换，即点突变。突变可以被遗传，可以在个体生命中的某些特定细胞中发生。某些特定的突变与某些癌症相关，或跟某些肿瘤的恶性程度相关。

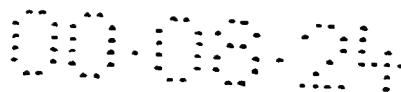
单核苷酸多态性（Single nucleotide polymorphisms, SNPs）是由于基因组在核苷酸水平的单个碱基的变异引起的 DNA 序列的多样性。在某些情况下，SNPs 这种点突变可以作为诊断遗传缺陷的依据，例如，镰刀形细胞贫血症。在某个群体如人类某个种群中，SNPs 是基因组中可能发生一定程度的序列可变性的位置。病人对一种或多种药物或试剂的应答能力与 SNPs 相关，因此对它们的鉴别对药物遗传组学十分有用。鉴别特定 SNP 位点的核苷酸可以十分可靠的鉴定某一个体，这在遗传诊断、犯罪学和司法鉴定上有很大的应用前景。



点突变和 SNPs 对个体健康有十分重要的影响，同时也为个体鉴定提供了一个十分可靠的方法，但是点突变和 SNPs 却很难有效地进行检测。虽然用 DNA 芯片检测点突变和 SNPs 的方法通常有好几种，但这些方法都依赖于在芯片上杂交和检测之前扩增所需的 DNA。扩增方法本身就可能導致碱基的错配从而在鉴定已知或未知的突变或 SNP 位点时提供不正确的信息。此外，在许多情况下，基因表达中的突变或 SNP 的鉴定至关重要，因为许多基因在特定的情况下在特定的组织中不表达。SNPs 也适用于对遗传混乱或癌症中增大或缺失的基因或基因区域的鉴定。在许多实例中，肿瘤的分类是根据鉴定典型的基因增大或缺失来实现的(Pollack et al. (1999) *Nature Genetics* 23: 41-46; Arribas et al. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 3454-9; Tanner et al. (1995) *Clin. Cancer Res.* 1: 1455-61)。依赖于 PCR 的突变分析方法很难定量，依赖于凝胶电泳的方法则需要花费大量的时间而且在一次分析中只能分析有限数目的基因。SNPs 也可以通过以质谱为基础的方法检测包含 SNPs 位点的 DNA 片段分子量的不同。但这种方法由于质谱本身和所使用实验仪器的昂贵而限制了它的应用。

本发明考虑到目前在固体载体上很难获得可靠、定量的基因表达数据；而用 RNA 酶保护的方法获取基因表达信息时，不仅困难，而且要耗费大量的人力和时间。本发明同时也考虑到需要有效地描述特定的突变或序列变化的特征，如 SNPs 或基因增大，可以描述特定的疾病状态或基因型，可以提供在某一情况下表达的基因序列信息。

图 1A 描述了发明的一个实施方案：在核酸杂交芯片上，用能耐受核酸酶酶解的 DNA 探针从 RNA 分子群体中鉴定表达的基因，并在芯片上在核酸延伸过程中掺入带标记的核苷酸实现对核酸的标记。



6

图 1B 描述了发明的一个方面：在核酸杂交芯片上，用能耐受核酸酶酶解的 RNA 片断从 RNA 分子群体中鉴定表达的基因，并在芯片上对核苷进行标记。

图 2 描述了发明的一个方面：在核酸杂交芯片上，用已标记的能耐受核酸酶酶解的 DNA 探针从 RNA 分子群体中鉴定表达的基因。

图 3 描述了发明的一个方面：两个 RNA 待测群体分别与一系列标记的核酸探针分子杂交，与第一个群体杂交核酸探针分子和与第二个群体杂交的核酸分子标记了不同的标记物，这两个群体的能耐受核酸酶酶解的探针分子都与同一块芯片杂交。

图 4 描述了发明的一个方面：通过能耐受核酸酶酶解的 DNA 探针杂交阵列和 RNA 分子群体杂交鉴定表达的基因，标记的信号核酸分子和固定的核酸分子/能耐受核酸酶酶解的核酸分子复合体在芯片上杂交。

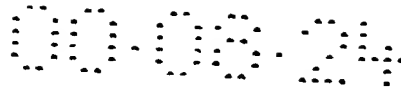
图 5 描述了发明的一个方面：通过能耐受核酸酶酶解的 DNA 探针和 RNA 分子群体杂交鉴定基因表达，固定的核酸分子都做有标记，芯片在杂交后用核酸酶解活性处理。

图 6A 描述了发明的一个方面：突变或 SNPs 通过能耐受核酸酶酶解的 RNA 片段和芯片的杂交从待测的 RNA 分子群体中检测出来，并在芯片上掺入标记的核苷。

图 6B 描述了发明的一个方面：突变或 SNPs 通过能耐受核酸酶酶解的 DNA 片段和芯片的杂交从待测的 DNA 分子群体中检测出来，并在芯片上掺入标记的核苷。

图 7A 描述了发明的一个方面：突变和 SNPs 通过末端标记的 DNA 探针和来自正常细胞的待测的 RNA 分子群体杂交检测，然后探针在芯片上通过核酸酶处理和杂交。

图 7B 描述了发明的一个方面：突变和 SNPs 通过末端标记的 DNA 探针和来自不正常细胞的待测的 RNA 分子群体杂交检测，然后探针在芯片上通过核酸酶处理和杂交。



17

图 8 描述了发明的一个方面：从 DNA 分子群体中，通过和能耐受核酸酶酶解的 DNA 片段和芯片的杂交检测突变或 SNPs，后来标记信号的核酸分子和固定在芯片上的核酸分子互补。

本发明认识到对于发育过程、应激反应和疾病发生等过程的基因表达的测定可以增进人们对相应基因的生物学功能的理解，有助于确定药物作用的靶点。另外，本发明认识到快速可靠的得到遗传变异（如突变和 SNPs）图谱，对于疾病诊断、疾病预测、司法鉴定、遗传鉴定和药理基因组学都有重要的意义。

本发明的一个方面是提供了基于与它们互补的已知序列，或在一个核酸分子群体中的一种或多种突变或 SNPs，鉴别一个或多个核酸分子，这些核酸分子可以是在特定的条件下表达的。本方法包括：在促进核酸杂交的条件下，至少一种探针与待测核酸分子群体中的核酸分子杂交产生探针-待测核酸分子混合物群体，用核酸酶处理探针-待测核酸分子混合物群体，使对核酸酶敏感的核酸分子都被消化，含有抗核酸酶活性的核酸分子和固体载体上固定的一种或多种核酸分子杂交，产生固定核酸分子-探针核酸分子复合物，检测一种或多种杂交复合物。

本发明的另一个方面提供了运用本发明的组合物。这些组合物将以试剂盒的形式出现，其中包含固体载体，包含第一套固定的核酸分子和不固定在固体载体上的第二套核酸分子。第二套核酸分子的成员至少部分与第一套核酸分子互补或至少能部分与第一套的核酸分子相同，且每个分子至少有一种可被检测的标记。这样的试剂盒也可以包括其它成分，比如至少一种附带的核酸分子群体，或是一种或多种核酸酶解活性的物质，一种或多种聚合酶，缓冲液或试剂，一种或多种核苷酸，其中一种或多种带有可检测的标记。

除了专门定义之外，本发明所用的技术和科学术语都和普通理解的意思相同。一般来说，在文章中使用的命名和描述与在化学、微

生物学、分子生物学、细胞科学和细胞培养的实验过程中的命名和描述都是众所周知和经常使用的。在这些过程中使用了习惯性用法，比如那些在文章中和多种的参考资料中提及的 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1998); Harlowe and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)), 一个术语即使是以单数形式出现，发明者也可考虑它的复数形式。在这里文章中使用的命名和在下面描述的实验过程都是众所周知的和普遍使用的。贯彻整篇文章，下面的术语尽管在整篇文章中使用，如果不是特别说明，都以下面的解释为准：

“生物体”是指任何种类的原核细胞生物或真核细胞生物，包括病毒、原生生物和多细胞生物。多细胞生物包括脊椎动物、无脊椎动物等等。“生物体”还可以指相联系的两种或多种生物物种，如被细菌感染的细胞、被疟原虫感染的动物等等。

“核酸分子”是指多聚核苷酸。核酸分子可以是 DNA、RNA 或两者的组合。核酸分子也可以包括除了核糖和脱氧核糖外组成骨架链的糖类，可以是 DNA 或 RNA 之外的核苷酸分子。核酸分子可以由自然存在的或非自然存在的核苷酸碱基组成，如黄嘌呤，核苷碱基的延伸物 2-氨基酰嘌呤或类似物等。核酸分子可以是肽核酸分子。核酸分子可以是任意长度，可以是单链或双链，或者是部分单链和部分双链。

“探针”或“核酸探针分子”是指至少部分是单链的核酸分子，它们和感兴趣的序列至少部分互补，或至少部分基本互补。探针可以是 RNA、DNA 或两者的混合。本发明同时考虑到了骨架链可以由除了核糖或脱氧核糖之外的其它糖类构成。核酸探针也可以是肽核酸。探针的组成部分可以包括抗核酸酶解活性的联接部分或是可被检测的标记部分，也能和其它成分连接，比如肽。



“互补”是指一条单链核酸分子的碱基与另一条单链核酸分子全部或是部分碱基可以配对（杂交）形成一个双螺旋结构分子（双链核酸分子）的能力，这种配对基于鸟嘌呤（G）对胞嘧啶（C）和腺嘌呤（A）对胸腺嘧啶（T）或尿嘧啶（U）的特异结合的基础上。例如，核酸序列 5'-TATAC-3'和 5'-GTATA-3'是互补的。

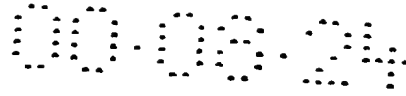
“基本互补”是指核酸遵循严格条件选择性的与另一条链杂交。

“选择性杂交”是指可检测的特异结合。多聚核苷酸、寡核苷酸和核酸片段选择性地与靶核酸链杂交，控制杂交和洗涤条件使得可被检测到的非特异结合的核酸的数目减到最小。技术领域中所熟知的高严格度条件可以用来达到选择性杂交条件。通常，在多聚核苷酸、寡核苷酸和核酸片段与感兴趣的核酸序列之间，核酸序列的互补性最少是 30%，比较常见的是至少在 40%、50%、60%、70%、80%、90%直至 100%。可以改变杂交条件如盐离子浓度、温度、去污剂和变性剂如甲酰胺等的用量而提高杂交的灵敏度，简而言之，要求在核酸链的杂交过程中，使得 C 与 G 精确配对，A 与 T 或 U 精确配对。

“一致”是指一个多聚核苷酸序列和另一个多聚核苷酸的序列是完全或是至少部分相同的。与之相比较，“互补”在这里的意思是是指一个多聚核苷酸序列和另一个多聚核苷酸的序列是完全或是至少部分碱基配对的。举个例子说明，序列 5'-TATAC-3'和序列 5'-TATAC-3'是一致的，而和序列 5'-GTATA-3'是互补的。

“序列相同”或“完全相同”的意思是通过比较，两个多聚核苷酸的序列是一样的（以一个核苷对应一个核苷为基础的）。“部分序列相同”或“部分相同”的意思是核酸分子的部分序列至少和另一个核酸分子的部分序列是相同的。

这里用“基本相同”或“基本完全相同的”来表示一个多聚核苷酸序列的特征。是指一个核酸序列，与一个至少是 20 个核苷（更经常的是至少 25~50 个核苷）的多聚核苷酸的涉及序列相比较，包含了至少 30%序列相同的序列，更常见的是至少 50~60%序列相同，甚



22

至至少是 60% 的序列相同。“基本部分序列相同”或“基本部分完全相同”是指当部分核酸分子是基本上的、至少与另一核酸分子的部分相同时的情况。在这里用的“相同”或“完全相同的”指组成核酸的碱基，而不包括其它的成分，例如骨架链可以由一种或多种糖类和一种或多种磷酸或其它替代成分组成。

“可被检测的标记”是一种可以被检测的复合物或分子，它们可以产生输出信号，如荧光、放射性、颜色、化学发光或技术领域现有的或是今后发展出的能产生输出信号的方法。输出可以基于荧光，如通过荧光标记物，例如 Cy-3，Cy-5，藻红蛋白，藻蓝蛋白，别藻蓝素，异硫氰酸荧光素（FITC），罗丹明，或镧系元素等等，但不是仅仅限制于以上物质；也可以通过荧光蛋白如绿色荧光蛋白（GFP）和它的变体，要基于酶反应的活性，比如，但不仅仅限于 β -牛乳糖， β -内酰胺酶，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶或荧光素酶等等；或者可以基于放射性同位素（如 ^{33}P ， ^3H ， ^{14}C ， ^{35}S ， ^{125}I ， ^{32}P 或者 ^{131}I 等）。标记物也可以是被其它基团修饰了的碱基，比如，在 C5 位置修饰嘧啶或在 N7 位置修饰嘌呤。修饰基团可以是多种多样的，例如卤素、醚或者聚醚、烷基、脂类或聚脂类，或常见的 XR，在这里，X 是连接基团，R 是修饰基团。在修饰技术领域，存在许多种有效的可能适用于修饰核酸分子、寡核苷酸分子及其类似物的方法。（A Practical Approach, Eckstein, ed. (1991) and in PCT/US94/00193.）

“标记”或“标记的”是指被测物质与可检测记号的结合，例如通过结合荧光或放射性复合物，或连接一个可以被另一成分检测到的成分如生物素，可以被标记的抗生物素蛋白结合并检测。技术上存在许多不同的标记核酸的方法。

“突变”即在标准野生型基因组序列上发生了变化。突变可以是序列的缺失、序列的插入，或是在基因组的某一位置发生重组，也可以是基因组某个位置的单个碱基被置换，即点突变。突变可以被遗传，可以在个体生命中的某些特定细胞中发生。



2/

“可操作性连接”是指在组成中与允许以其已有的方式发挥功能相关的毗邻位置，例如，一控制序列操作性地连接到编码序列，使得在和控制序列相一致的条件下，编码基因的表达得以完成。

“感兴趣序列”是指这样一段序列，由于它的存在或变异，可以通过本发明的方法，被一种或多种待测核酸群体检测到的。

“待测核酸分子群体”是至少包括两种核酸分子的一个群体，它们都已被测定存在感兴趣的序列。一个待测群体核酸分子可以是 DNA 或 RNA。待测群体核酸分子可以来自任何来源，比如是人类、动物、植物或微生物资源。待测群体可以从各种组织中（包括但不限于头发、血液、血清、羊水、精子、尿液、唾液、咽喉或生殖器官，活组织切片样品，尸体样品）或细胞中，包括人工培养的细胞，以及活体样品或非活体样品中或患者中分离出来的。待测群体也可以从没有生命的材料、残迹或史前古器物包括化石材料中分离出来。

“杂交”是指单链核酸或核酸的单链部分的碱基配对过程，从而产生双链核酸或带部分双链的核酸分子。

“核酸探针和待测核酸群体混合物”是指包含了核酸探针分子和待测群体核酸分子的混合物。更适宜的，核酸探针分子和待测群体分子是在促进核酸分子间杂交的条件下互相接触的。这里的核酸分子至少部分互补或部分基本相同。

“核酸酶解活性”或“核酸酶解剂”可以切割核苷键降解核酸分子。核酸酶解活性或试剂可以是酶，比如脱氧核糖核酸酶 I，核酸外切酶 III，绿豆核酸酶，S1 核酸酶，核糖核酸酶 H，或核糖核酸酶 A，也可以是化学试剂，如过氧化氢，四氧化钼，羟胺，或高锰酸钾，或者是一定的化学环境，如高或低的 pH 值。

“突出端”是指双链核酸分子末端的单链区域。

“固定的核酸分子”是结合到固体载体的核酸分子。固定的核酸分子可以有不同的长度，可以是单链或双链，或部分单链和部分双链，带有人工联接物，如抗核酸酶解活性的骨架链联接，例如，但

不仅仅限于，磷酸盐，甲基磷酸盐或硼酸-磷酸盐。固定的核酸分子可以是 DNA、RNA 或两者的混合物。本发明的范围还包括：组成探针分子的核酸，它的糖链骨架可以由除了核糖或脱氧核糖以外的糖基构成，例如，某些己糖可以作为替代品。核酸探针分子也可以是肽核酸。固定的核酸分子可以逆转或不可逆的结合到固体载体上。和固体载体的结合是直接或非直接的。如果核酸分子是直接结合到载体上，则可以通过 3' 或 5' 端进行结合。

“固定的核酸分子-能耐受核酸酶酶解的核酸分子复合物”或称为“杂交复合物”是一种包括至少一种固定核酸分子和至少一种经过核酸酶解活性处理的核酸分子的复合物。杂交复合物中的经过核酸酶解活性处理的核酸分子可以是经过核酸酶解活性部分消化了的核酸分子的一部分，也可以是一种全部带有能耐受核酸酶酶解的核酸分子。杂交复合物中的固定核酸分子和能耐受核酸酶酶解的核酸分子应该是至少部分互补的。杂交复合物可以有其它成分组成，例如（但不是仅仅限于）附加的核酸分子。一种或多种杂交复合物的核酸分子带有可检测的标记。

“能耐受核酸酶酶解的核酸分子”是指至少一种经过一种或多种核酸酶解活性处理的核酸分子，仍然没有被降解的核酸分子。能耐受核酸酶酶解的核酸分子可以是单链或双链，或者是部分单链和部分双链。能耐受核酸酶酶解的核酸分子对一种或多种核酸酶解活性有抵抗力。对核酸酶解活性的核酸分子的抵抗力是可以获得的，例如当在用核酸酶解活性处理核酸分子时（包括在双链状态），构造核酸分子，或通过选择核酸分子的序列，或通过连接一种或多种核苷。能耐受核酸酶酶解的核酸分子可以作为能耐受核酸酶酶解的待测核酸群体或其中的片段，或作为能耐受核酸酶酶解的核酸探针分子或它的片段，或可以组成所有或部分的待测群体的核酸分子和核酸探针分子。另外，在某些具体时候，固定的核酸分子或它的部分可以是能耐受核酸酶酶解的核酸分子。能耐受核酸酶酶解的

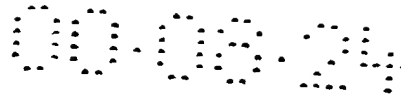
核酸分子可以引入或是可操作性连接到其它复合物上，例如肽，化学物质，和/或标记。

“能耐受核酸酶酶解的核酸分子复合物”或“受保护复合物”是指经过一种或多种核酸酶解活性处理的一种或多种核酸分子的复合物。受保护复合物中的一种或多种核酸分子，或受保护复合物分子的一部分或更多部分可以是单链。受保护复合物中的一种或多种核酸分子，或受保护复合物分子的一部分或更多部分也可以是双链。典型的能耐受核酸酶酶解的核酸复合物的核酸分子对一种或多种核酸酶解活性有抵抗力，不会被降解。对核酸酶解活性的抵抗力是可以获得的，例如，通过构造核酸分子（包括在双链状态），通过核酸分子的碱基序列，通过在核酸分子上连接一种或多种核苷。能耐受核酸酶酶解的核酸复合物也可以包括其它化合物，例如肽、化学物质，和/或标记。

“信号核酸分子”是指与感兴趣的序列相比，核酸分子至少是部分单链的，并且至少是部分互补的，或至少部分基本互补的，或至少是部分相同的，或至少是部分基本相同的。探针可以是 RNA 或 DNA，或是 RNA 和 DNA 的组合。本发明的范围还包括：组成探针分子的核酸，它的糖链骨架可以由除了核糖或脱氧核糖以外的糖基构成，例如，某些己糖可以作为替代品。核酸探针也可以是肽核酸，探针连接有抗核酸酶的部分，并且可以连接到其它部分，例如，一个肽或一个化学基团如生物素。信号核酸分子适宜携带可检测到的标记。

“单核苷酸多态性”或“SNP”是指同一物种的不同个体中，它们在同一序列的同一位点核酸碱基组成不同的现象。

“固体载体”是指表面可以固定分子、复合物、细胞或其它实体的固体材料。固体载体表面可以是平的也可以是不平的；可以是多孔的，也可以是致密的。固体载体可以作为芯片或阵列的基面，这个基面可以是由玻璃、硅、尼龙、聚合体、塑料、陶器或金属组成。



24

固体载体也可以是膜，比如尼龙膜、硝酸纤维素膜，或聚合物形成的膜，或者是由玻璃、陶瓷、金属或塑料组成的面状或是盘状结构，例如，由聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯或聚异质同晶体作成的 96 孔板。固体载体也可以是珠体或各种形状的微粒，最好是球形的或近球形。珠体或微粒的直径或最大宽度最好不超过 1 毫米，最适宜的是在 0.5 到 100 微米。微粒或珠体可以由各种材料组成，如玻璃或陶瓷和 / 或一种或多种聚合体如尼龙、聚四氟乙烯、特氟隆 (TEFLON™)、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素、纤维素衍生物、或葡聚糖等，和 / 或金属、特别是顺磁性金属，如铁等。

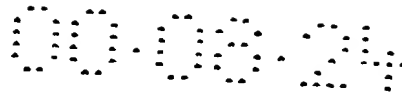
“特别亲和物”是两种不同分子中的一种，这两种分子的表面或孔穴中有一块可以特异结合的区域，因此定义为和其它分子的特定空间或极性组织互补。一个特别亲和物可以是免疫家族的成员，例如抗原-抗体，生物素-抗生物素蛋白，激素-激素受体，核酸二倍体，免疫球蛋白 G-蛋白 A，DNA-DNA，DNA-RNA，还有与此类似的。

“基本线性”的意思是，当作图时，产品的增长和时间成线性关系，或接近算术级数。

目前用于基因表达定量分析的各种方法都比较费力、耗时，且难以应用。因而需要一种可以并行、快速、可信、定量地在一次实验中就可以分析多个基因表达信息的方法。目前用于分析基因突变和单核苷酸多态性 (SNPs) 的方法也存在缺陷，如用 PCR 方法扩增得到的 DNA 本身就可能引进错误的碱基，并且此类方法不能区分在所研究的细胞或组织中表达的基因和不表达的基因。这项发明出于解决上述的问题、满足上述的需要而出现。

和其它方法相比，本发明改进了基因表达分析、基因突变检测和 SNPs 检测的方法。同时这项发明还具有了一些其它的优点。

作为对这项发明的全面介绍，它包括以下部分：



25

- 1) 是一种可以鉴别在一个或多个细胞、组织或其它样品中所表达核酸分子的方法。
- 2) 是一种可从一个或多个细胞、组织或其它样品中得到的核酸群体中鉴别一个或多个突变或 SNPs 的方法。
- 3) 它的组成包括至少固定了一种核酸分子的至少一个固体载体, 和与固体载体固定的核酸分子部分互补或至少部分基本互补或部分相同或至少部分基本相同的一组核酸分子。

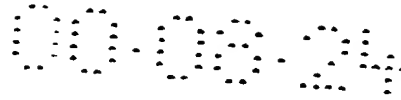
本发明的以上方面, 以及在此文描述的其它方面, 可以在本发明的方法、操作手册和系统组成中找到。

1. 通过核酸酶解活性和杂交技术来鉴别所表达的核酸分子的方法

本发明包括一种可以鉴别至少一种发生表达的核酸分子, 例如在一个或多个细胞中表达的核酸的方法, 本发明也包括可以检测一个样品中例如生物样品或环境样品中的核酸分子的方法。此方法包括: 把至少一种核酸探针分子和待测核酸群体在有利于杂交的条件下进行反应, 然后用核酸酶处理此核酸和探针的混合物, 以使对核酸酶解活性敏感的核酸发生降解, 剩下能耐受核酸酶酶解的核酸分子。把此能耐受核酸酶酶解的核酸分子和连接有一种或多种核酸分子的固体载体在有利于杂交的条件下进行反应, 得到能固定核酸分子/耐受核酸酶酶解的核酸分子复合物。然后在一个或多个固体载体上固定的核酸分子/能耐受核酸酶酶解的核酸分子的复合物中鉴别一个或多个固体载体上固定的核酸分子或一个或多个受能耐受核酸酶酶解的核酸分子。

以下实施方案是基于描述的目的, 但不应仅仅限于这些说明。应该意识到此文中提到的一些替代和结合的方法、步骤、组成也包括在本发明中。

与基因表达图谱有关的实施方案



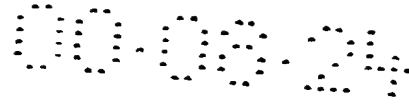
76

本发明用于基因表达分析，以鉴别出特异的生物类型、细胞类型或组织类型的基因表达情况。通过鉴别在特定时间、特定发育阶段、或特定的条件下的基因表达情况，可以得到基因表达图谱。利用本发明的方法构建的表达图谱可以定量地分析基因表达的相对量。

本发明可用于检测基因的部分碱基序列，因而可以检测到不同基因相同的部分或检测到一个基因转录物的多个区段。本发明中设计的探针分子至少部分互补或至少部分基本互补于一个特异基因的一个或多个区段，或具有相同序列的不同基因的一个或多个区段，例如来源于不同基因家族的基因转录物的组合体或是由病毒产生的变异基因转录物这些经过剪切产生的基因变异转录物（isoform，异构体）。

本发明也可用来检测样品，例如生物样品中致病微生物的核酸序列，或环境样品中所污染的样品的核酸序列。当然并不受限于以上几个例子。本发明中的方法也能定量检测在一个或多个细胞如恶性肿瘤细胞中某个基因的拷贝数。以下图中所描述的是对本发明的具体解释，但并不意味着发明的全部仅仅就是图中所描述的内容。

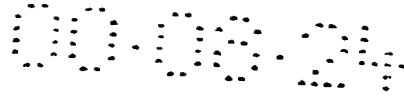
本发明的具体内容在图 1A 中阐明。在构建基因图谱的例子中，所待测群体是从细胞中抽提得到的 RNA，设计一组 DNA 探针，这些探针与这个 RNA 群体中存在的或是可能存在的 RNA 互补；本发明也设计了一组以阵列形式固定在固体载体上的寡聚核苷酸分子，与探针 DNA 序列至少部分互补。具体说，探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测 RNA 反应，然后此混合物用对核酸单链特异性的核酸酶如绿豆核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后使该核酸酶失活，如加入 EDTA；剩余的杂交核酸分子再用核酸酶处理如用核糖核酸酶 H，以除去与 DNA 探针杂交的 RNA 分子，于是得到只含有 DNA 探针的溶液，此剩余的 DNA 探针可以定量代表与其互补的 RNA 分子的拷贝数。具体来说，来源于不受单链核酸特异性降解的单链核酸是与表达基因序列互补的 DNA 探针，这些探针分子与 DNA 阵列上



27

的固定的核酸分子发生杂交。事先已设计好在两者杂交后，在杂交复合物的一端或两端都有单链突出端，经过事先设计，单链突出端的核酸碱基数符合一定的标准。洗去没有与 DNA 阵列上的固定的核酸分子发生杂交的 DNA 探针，再把此 DNA 阵列用 DNA 聚合酶如大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片断处理，同时反应体系中加入带有标记的核苷酸，于是在 DNA 聚合酶的作用下，以有突出端的 DNA 探针为模板来延伸 DNA 阵列上固定的核酸分子，延伸过程中会掺入标记核苷酸。为了不使 DNA 探针以固定在固体载体上的核酸分子为模板延伸，通常可以通过对 DNA 探针的修饰达到这一目的，比如在 DNA 探针的 3' 末端用不能进行延伸反应的双脱氧核苷酸代替脱氧核苷酸。清洗阵列后，进行扫描，在阵列的某一位置检测到标记信号表明所检测的 RNA 群体中有与此位置连接寡聚核苷酸相一致的特异 RNA 拷贝存在。

本发明的拓展部分在图 1B 中阐明。这里待测群体是从细胞中抽提得到的 RNA，设计一组 DNA 探针，这些探针与这个 RNA 群体中存在的或是可能存在的 RNA 互补；本发明也设计了一组以阵列形式固定在固体载体上的寡聚核苷酸分子，与探针 DNA 序列至少部分一致。具体说，探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测 RNA 反应，然后此混合物用对核酸酶如绿豆核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后使该核酸酶失活，如加入 EDTA；剩余的杂交核酸分子再用不含核糖核酸酶的脱氧核糖核酸酶处理，以除去与 RNA 杂交的 DNA 探针，于是得到经过核酸酶处理的只含有 RNA 的溶液。再将这 RNA 溶液与 DNA 阵列上的固定的核酸分子发生杂交。和上一个例子一样，通过设计合适长度的探针和固定的核酸分子，可以使得在两者杂交后，单链突出端的核酸碱基数符合一定的标准。洗去没有与 DNA 阵列上的固定的核酸分子发生杂交的 RNA，再把此 DNA 阵列用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶如 MMLV 反转录酶处理，同时反应体系中加入带有标记的核苷酸。于是在反转录酶的作用下，以有突出端的 RNA

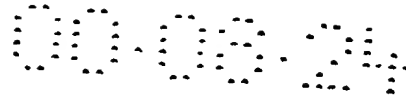


2/8

分子为模板来延伸 DNA 阵列上固定的核酸分子，延伸过程中会掺入标记核苷酸。清洗阵列后，进行扫描，信号的强度与在此位置上形成的杂交体数量成正比，在阵列的某一位置检测到标记信号表明所检测的 RNA 群体中有与此位置连接寡聚核苷酸互补的特异 RNA 拷贝存在。

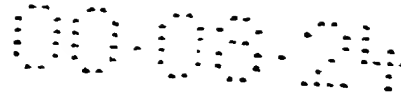
图 2 具体阐明的是，待测对象是从细胞中抽提得到的 RNA 群体，设计了一组与 RNA 群体中存在的或是可能存在的 RNA 分子互补的 DNA 探针分子。此 DNA 探针分子应包括至少一个可检测的标记，例如所有 DNA 探针分子带有相同活性的标记分子，或者产生相同或可比的信号强度。也用到了一组以阵列形式固定于固体载体上的寡聚核苷酸分子，与 DNA 探针至少部分互补。具体来说，DNA 探针与 RNA 群体在有利于杂交的条件下反应，然后此杂交体系用单链特异性的核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后让酶活性终止。剩余的杂交核酸分子用核糖核酸酶处理，以除去与 DNA 探针杂交的 RNA 分子，于是得到只含有 DNA 探针的溶液，此剩余的 DNA 探针是整组探针中的一部分，可以定性、定量代表与其互补的 RNA 分子的拷贝数。再将此 DNA 探针与 DNA 阵列上固定的核酸分子发生杂交，洗去没有与 DNA 阵列上的固定的核酸分子发生杂交的 DNA 探针，阵列再进行扫描，在阵列的某一位置检测到标记信号表明所检测的 RNA 群体中有与此位置连接寡聚核苷酸相一致的特异 RNA 拷贝存在。信号的强度与在此位置上形成的杂交体数量成正比，故可以直接反映出和 DNA 阵列上此位置固定的核酸分子对应的基因在所检测的 RNA 群体中表达的拷贝数量。

图 3 是上述方法的衍生，在同一个阵列上检测来自于两个待测群体的 RNA 转录状况。具体来说，待测核酸群体都是 RNA 群体，例如，分别从正常的细胞中和非正常的细胞中抽提的 RNA，两者在两个独立的体系中分别各自与 DNA 探针进行杂交。两组用到的 DNA 探针碱基序列都是相同的，但带有不同的检测标记，因而可以区分



出与探针发生了杂交的 RNA 来源。每个 DNA 探针与 RNA 的杂交体系都用单链特异性的核酸酶处理，剩余的杂交核酸分子用核糖核酸酶处理，得到各自的 DNA 探针组。两者再与同一 DNA 阵列上的核酸分子杂交。洗去没有与 DNA 阵列上固定的核酸分子发生杂交的 DNA 探针分子，然后对阵列进行扫描检测。在阵列的某一位置检测到信号若是与正常的细胞来源的 RNA 杂交的 DNA 探针所带标记信号，则表明在正常细胞中有与 DNA 阵列此位置连接寡聚核苷酸相对应的特异 RNA 拷贝存在；同样，检测到信号若是与非正常的细胞来源的 RNA 杂交的 DNA 探针所带标记信号，则表明在非正常细胞中有与 DNA 阵列此位置连接寡聚核苷酸相对应的特异 RNA 拷贝存在。在 DNA 阵列上的每一位置都可以鉴别出是否有信号及信号是来自哪一组探针。信号强度可以直接反映出 DNA 阵列上此位置固定的核酸分子对应的基因在所调查的 RNA 群体中表达的拷贝数量。这项发明使得在两个 RNA 群体中检测所感兴趣基因的相对表达量成为可能。其中 RNA 群体可以从两种不同的细胞、分别处于两种不同条件的同种细胞或是位于两种不同生物体的同种细胞等等。

图 4 表明的是在构建基因图谱的另外一种衍生方法中，待测核酸群体是从细胞中抽提得到的 RNA，还用到了—组待测核酸群体中存在和可能存在与怀疑存在的 RNA 互补的 DNA 探针；也用到了—组以阵列形式连接于固体载体上的寡聚核苷酸分子，并且与 DNA 探针至少部分互补。由于 DNA 探针分子与固体载体上的核酸分子部分互补，因而部分 DNA 探针能与固体载体上的核酸分子互补；而另一部分与固体载体上的核酸分子不互补。具体来说，DNA 探针与 RNA 在有利于杂交的条件下反应，然后此杂交体系用单链特异性的核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后让酶活性终止，例如加入 EDTA。剩余的杂交核酸分子再用核酸酶如核糖核酸酶 H 处理，以除去与 DNA 探针杂交的 RNA 分子，于是得到只含有 DNA 探针的溶液，此剩余的 DNA 探针是整组探针中的一部分，可以定性、定量代表与其互补



35

的 RNA 分子的拷贝数。再将这些 DNA 探针与 DNA 阵列上固定的核酸分子发生杂交，洗去没有与 DNA 阵列上的固定的核酸分子发生杂交的核酸分子。然后用另外一组带标记的核酸分子与阵列进行杂交。这组带标记的核酸分子是与 DNA 探针分子上不与固体载体上的核酸分子互补的另外一部分碱基序列互补的。此 DNA 分子应包括至少一个可检测的标记，例如所有 DNA 探针分子带有相同活性的标记分子，或者产生相同或可比的信号强度。清洗阵列后，进行扫描，在阵列的某一位置检测到标记信号表明待测 RNA 中有与此位置固定的寡聚核苷酸相对应的特异 RNA 拷贝存在。信号的强度与在此位置上形成的杂交体数量成正比，故可以直接反映出 DNA 阵列上此位置固定的核酸分子对应的基因在待测 RNA 群体中有多少个表达的拷贝数。

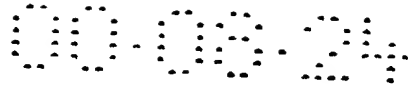
图 5 具体阐明了发明的另外一种方法。待测群体是从细胞中抽提得到的 RNA，还用到了一组与 RNA 群体中存在或可能存在的 RNA 互补的 DNA 探针；也用到了一组以阵列形式固定于固体载体上的寡核苷酸分子，与 DNA 探针至少部分互补。此阵列 DNA 分子应包括至少一个可检测的标记，例如所有 DNA 探针分子带有相同活性的标记分子，或者产生相同或可比的信号强度。确切地说，阵列上固定的核酸分子有一个或多个抗核酸酶的化学键，例如磷硫键 (phosphothioate)，它们是位于核酸分子靠近阵列支持物的末端；也有一个或多个可被核酸酶降解的化学键，例如磷酸二酯键，它们不位于核酸分子靠近阵列支持物的末端。带有标记的部分就在或是连接在对核酸酶敏感的部分。核酸探针分子与阵列上固定的核酸分子部分互补，因而它们杂交时，阵列上固定的核酸分子与核酸探针分子发生杂交配对的区域是核酸酶敏感的，并且有可检测的标记。具体说，探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测 RNA 反应，然后此混合物用对核酸单链特异性的核酸酶如绿豆核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后让酶活性终止例如通过加入 EDTA；剩余的杂交核酸分子再用核酸酶如核糖核酸酶 H 处理，以除去与 DNA 探针杂交的

RNA 分子，于是得到只含有 DNA 探针的溶液，此剩余的 DNA 探针是整组探针中的一部分，可以定性、定量代表与其互补的 RNA 分子的拷贝数。此来源于受核酸酶保护的 DNA 探针与 DNA 阵列上固定的核酸分子发生杂交，洗去没有与 DNA 阵列上固定的核酸分子发生杂交的核酸分子。阵列用单链特异性的绿豆核酸酶处理，使对单链核酸酶敏感的核酸键断裂。如果 DNA 探针与 DNA 阵列上固定的核酸分子未发生杂交，则 DNA 阵列上固定的核酸分子中掺入的标记核苷酸就会被单链核酸酶裂解释放出来。阵列被清洗后再进行扫描，在阵列的某一位置检测到标记信号表明待测 RNA 中有与此位置固定的寡聚核苷酸相对应的特异 RNA 拷贝存在，信号的强度与在此位置上形成的杂交体数量成正比，故可以直接反映出 DNA 阵列上此位置固定的核酸分子对应的基因在待测 RNA 群体中有多少个表达的拷贝数。

与基因突变检测与 SNP 检测有关的实施方案

本发明的方法和组成也可以用来检测基因突变和 SNP。可以以 RNA 作为检测对象来检测表达基因中的基因突变和 SNP，尽管这不是本发明的要求。

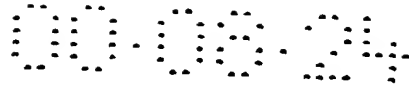
图 6A 具体阐明了本发明。待测群体是从细胞中抽提得到的 RNA，还用到了一组与 RNA 群体中存在或可能存在的 RNA 互补的 DNA 探针；也用到了一组以阵列形式固定于固体载体上的寡核苷酸分子，与 DNA 探针至少部分互补。它们的 3' 端不与载体相连，而已知的或怀疑存在的突变或 SNP 位点就位于 DNA 探针的 3' 端。具体来说，核酸探针分子包含有已知的或怀疑存在的突变或 SNP 位点，这些位点不位于核酸分子末端。核酸探针分子的一个区域与固定的核酸至少部分相同或至少部分基本相同；核酸探针分子的另一个区域与固定的核酸不相同或基本不相同。探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测 RNA 反应，然后此混合物用对核酸单链特异性的核酸酶如绿豆核



3 2

酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后让酶活性终止如通过加入 EDTA；剩余的杂交核酸分子再用核酸酶如不含核糖核酸酶的脱氧核糖核酸酶处理，以除去与杂交体中的 DNA 分子，于是得到只含有 RNA 分子的溶液，这些 RNA 分子中含有想检测的突变或 SNP 位点。然后把此受核酸酶保护的 RNA 分子与 DNA 阵列杂交。已事先设计好阵列上的核酸分子与受核酸酶保护后的核酸分子杂交后，可使杂交复合体上的 RNA 分子留下一个单链突出端。此单链突出端里是从杂交复合体上要检测的突变位点和 SNP 位点延伸出来的。而阵列上的核酸分子与待测的核酸分子能否杂交，取决于 RNA 上的突变位点和 SNP 位点能否和固定在载体上的核酸分子互补。然后用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶，如 MMLV 反转录酶处理 DNA 阵列，同时反应体系中加入标记核苷酸。在阵列上的核酸分子如能与 RNA 上的突变位点和 SNP 位点互补，两者形成杂交体，则反转录酶能以 RNA 为模板延伸 DNA 阵列上固定核酸分子，延伸过程中会掺入标记核苷酸。清洗阵列后，进行扫描，在阵列的某一位置检测到标记信号表明与此位置连接寡聚核苷酸杂交的 RNA 上有相应的互补的突变或 SNP 位点存在。

图 6B 中检测 SNP 和突变位点的方法并不受限于表达的基因。待测群体可以是从小细胞中抽提得到的 DNA，还用到了一组 DNA 群体中存在或可能存在的 DNA 互补的 DNA 探针，此 DNA 探针可以用特异的基团如生物素进行标记，以用来捕获受能耐受核酸酶酶解的待测 DNA 分子与 DNA 探针分子形成的复合体。也用到了一组以阵列形式固定于固体载体上的寡聚核苷酸分子，与 DNA 探针序列部分一致。固体载体上的核酸分子的 3' 端不与支持物相连，而已知的或怀疑存在的突变或 SNP 位点就位于 DNA 探针的 3' 端。具体来说，核酸探针分子包含有已知的或怀疑存在的突变或 SNP 位点，这些位点不位于核酸分子末端。核酸探针分子的一个区域与固定的核酸至少部分相同或至少部分基本相同；核酸探针分子的另一个区域与固

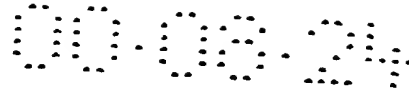


33

定的核酸不相同或基本不相同。探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测 RNA 反应，然后此混合物用对核酸单链特异性的核酸酶如绿豆核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后让酶活性终止如通过加入 EDTA。

杂交体应经过处理以释放出待检测的单链核酸，然后这待检测的单链核酸应该事先从探针核酸分子中纯化出来，以防止探针核酸分子在待测核酸分子与固定在载体上的核酸分子进行芯片杂交的过程中，与固定核酸分子竞争结合待测单链核酸。考虑到探针核酸分子带有生物素基团，所以可以通过吸附的方法来收集。如通过有链霉抗生物素蛋白包裹的磁珠与 DNA 上的生物素相吸附而收集。然后用使双链 DNA 变性的条件（如碱性 PH 值，低盐）处理磁珠，使待测 DNA 分子从磁珠上脱落下来。而留下探针核酸分子连接在磁珠上。将待测 DNA 通过乙醇沉淀等方法进行浓缩纯化，以备芯片杂交。

事先已设计好待测核酸分子与 DNA 阵列上固定的核酸分子杂交后，杂交体上待测核酸分子会留有单链的突出端，这单链的突出端从待测核酸分子上的突变或 SNP 位点延伸出来的。待测核酸分子与 DNA 阵列上固定的核酸分子能否发生杂交，取决于固定核酸分子上的序列是否与待测核酸分子上的突变或 SNP 位点互补。若互补，随后把此 DNA 阵列用 DNA 聚合酶如大肠杆菌 DNA 聚合酶的 Klenow 组分处理，同时反应体系中加入标记核苷酸，于是在 DNA 聚合酶的作用下，以有突出端的待测核酸分子为模板来延伸 DNA 阵列上固定的核酸分子；延伸过程中会掺入标记核苷酸。若以后者为模板来延伸前者，会得到假阳性结果。为了防止假阳性的出现，可以设计好 DNA 阵列上固定的核酸分子的碱基，使其全部（除了 SNP 位点）与待测核酸分子的部分互补。清洗阵列后，进行扫描，在阵列的某一位置检测到标记信号表明与此位置连接寡聚核苷酸杂交的所调查的 DNA 上有相应的互补的 SNP 位点存在，从而可以鉴别基因上的突变和 SNP 位点。

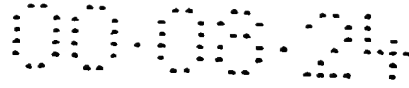


378

图 7A 和图 7B 具体描述的是，待测群体是来自正常细胞（图 7A）和非正常细胞（图 7B）的 RNA。一组探针分子的末端是已知或怀疑存在的突变或 SNP 位点，并且此突变或 SNP 位点的核苷酸是经过标记的。对于一个突变或 SNP 位点，能合成四种不同的探针以利于检测。每一种探针的末端用不同的标记物标记，能明显地被鉴别；例如，G 用 Cy3 标记，A 用 Cy5 标记等等。具体来说，探针与阵列上的连接核酸分子至少部分互补，或至少部分基本互补，并且至少部分互补或至少部分基本互补于待测核酸分子群体中的至少一种核酸分子。探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测 RNA 反应，然后此混合物用对单链核酸特异性的核酸酶如绿豆核酸酶处理，以消化单链核酸。由于探针末端是已知的或是可能存在的突变或 SNP 位点，此标记的末端可能会也可能不会与待测核酸分子序列互补，因而可能会也可能不会被单链核酸特异性的酶消化。如果不互补，探针末端标记的核苷酸会被切下；如果互补，探针末端标记的核苷酸会保留。单链核酸特异性的酶处理后，让酶活性终止如通过加入 EDTA。再去除待测群体中的核酸分子，如用核糖核酸酶消化。将剩余的探针核酸分子与 DNA 阵列进行杂交。检测到阳性信号表明在待测核酸分子分子中含有与阵列上此位点固定的 DNA 分子相对应的 SNP 或突变的核酸分子存在。

具体说明中遗漏的合并及修饰的部分也包括在本发明之内。例如，图 7 表明的 SNP 检测方法范围可以延伸到待测群体是 DNA，并且除了末端标记，还可以用生物素标记。生物素标记可用来在抗生物素蛋白包被的磁珠上捕获杂交体。在此衍生的方法中，待测核酸分子分子从杂交体上变性分开而除去，留下探针核酸分子连接在磁珠上。再把探针核酸分子从磁珠上洗脱下来用于芯片杂交。

图 8 具体说明的是，待测群体是一组含有存在或怀疑存在的 SNP 或突变位点的 DNA 分子，还有一组 DNA 探针与待测核酸群体是互补的或基本互补的。探针与阵列上可以连有特异基团如生物素的核



35

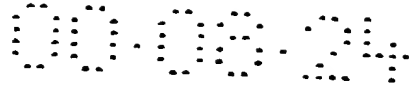
酸分子部分一致或部分基本一致。阵列上固定的核酸分子在至少一个不与载体连接的末端带有已知的或怀疑存在的 SNP 或突变位点序列。探针 DNA 在适于杂交的条件下与待测的 DNA 反应，然后此混合物用对核酸单链特异性的核酸酶如绿豆核酸酶处理，使单链核酸发生降解，然后让酶活性终止如通过加入 EDTA。

得到的杂交体核酸分子可以通过有链霉抗生物素蛋白包被的磁珠与 DNA 上的生物素相吸附而得以收集。然后用使双链 DNA 变性的条件（如碱性 PH 值，低盐）处理磁珠，使待测 DNA 分子从磁珠上脱落下来，留下探针核酸分子连接在磁珠上。再让洗脱下来的待测 DNA 分子与 DNA 阵列上固定的核酸分子杂交。事先已设计好待测核酸分子与 DNA 阵列上固定的核酸分子杂交后，在杂交体上待测核酸分子会留有单链的突出端，这单链的突出端恰好位于待测核酸分子上的突变或 SNP 位点或和它相邻。待测核酸分子与 DNA 阵列上固定的核酸分子能否发生杂交，取决于待测的 DNA 上的序列是否能与待测核酸分子上的突变或 SNP 位点互补。

如果探针上没有连有生物素之类的特异基团，在核酸酶处理并使酶失活后，待测核酸分子可以进行扩增。为了只扩增待测核酸分子而不是探针核酸分子，可以通过使用一种或几种和待测核酸序列互补或部分互补，但是和探针核酸序列完全不互补的引物来实现这一目的。

通过清洗去除未杂交的核酸分子后，再用一组信号核酸分子和阵列杂交。这组信号核酸分子的序列和探针核酸分子的序列一部分一致，但是和固定核酸分子的序列不同。也就是说信号核酸分子至少与能与探针核酸分子互补的待测核酸分子部分互补或部分基本互补。这样，待测核酸分子的一个区域和固定核酸分子互补或基本互补，而另一个区域和信号核酸分子互补或基本互补。

信号核酸分子可以与固定核酸分子相连接。连接反应仅仅在固定核酸分子和待测核酸分子的已知的或可能存在的突变和 SNP 位点完



3b

全互补的情况下才能进行。信号核酸分子应包括至少一个可检测的标记，例如所有 DNA 探针分子带有相同活性的标记分子，或者产生相同或可比的信号强度。在可以对双链 DNA 进行解链的条件下清洗，再扫描阵列。检测到信号的区域意味着此处发生了连接反应，说明此处的待测核酸分子与固定核酸分子的序列完全互补，即待测核酸分子带有与此处固定核酸分子相对应的突变或 SNP 位点。

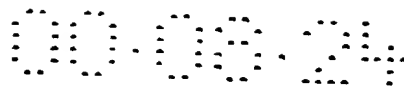
本发明的另外一种具体描述中，它的方法能用来检测某一样品中的特异的生物体。如在血液等生物样品中，或是食物或水等环境样品中检测细菌、病毒或其它微生物样品。

核酸探针分子

一种核酸探针分子可以是 RNA、DNA，或者由 RNA 和 DNA 两者组成。它还包括那些骨架链由除了核糖或脱氧核糖之外的糖类如某些己糖构成的核酸分子。核酸探针分子还可以是肽核酸。

本发明中的核酸探针分子可以带有除核酸中天然存在的磷酸二酯键以外的其它核苷键。例如，两个或更多的核苷可以由磷键相交接，这些磷键包括磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、3' — (或 5') 脱氧—3' — (或 5') 硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、硒酸盐磷酸酯键、3' — (或 5') 脱氧磷脂键、硼化磷酸键、3' — (或 5') 脱氧—3' — (或 5') 氨基五磷酰氨键、氢化磷酸酯键、甲基磷酸酯键、硼化磷酸酯键、亚磷酰氨键、甲基或芳香基磷酸酯键、和磷酸三酯键磷化键。其它或附加于其上，本发明的核酸探针可以含有两个或多个核苷亚基由以下键相连接：碳酸酯键(carbonate)、氨基甲酸酯键(carbamate)、甲硅烷基键(silyl)、硫键(sulfur)、磺酸酯键(sulfonate)、磺胺键(sulfonamide)、缩醛键(formacetal)、硫代缩醛键(thioformacetal)、亚氮甲基键(methylimino) 或 methylenedimethylhydrazo。

核酸探针分子可以含有自然或非自然存在的碱基或核苷，例如，腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶，以及次黄苷、黄嘌呤



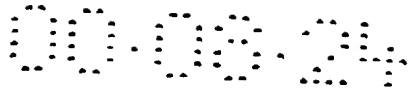
3

呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘧啶、6-甲基和其它腺嘌呤的烷基衍生物、2-丙基和其它腺嘌呤及鸟嘌呤的烷基衍生物、5-卤素尿嘧啶和胞嘧啶、5-propynyl 尿嘧啶和胞嘧啶、6-氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶（假尿嘧啶）、4-硫尿嘧啶、8-卤素氨基（巯基、硫代烷基、羟基和其它 8 位取代）腺嘌呤及鸟嘌呤、5-三氟甲基和其它 5 位取代尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤，其它的嘌呤和嘧啶包括在那些在美国专利 No.3, 687, 808 中公开的和《聚合体科学和工程简明百科全书》（1990）Kroschwitz, J.I ed., John Wiley and Sons, 858-859 页中公开的和由 Englisch et al.(1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613 中公开的。

本发明中的核酸探针分子可以为任何长度，但是适宜的长度为 5 到 500 核苷亚基，更适宜的长度为 10 到 250 个核苷亚基，最适宜的长度为 20 到 100 个核苷亚基。

本发明中的至少一种核酸探针分子是可以与核酸分子群体中一个或多个已知存在或可能存在的核酸分子至少部分互补或至少部分基本互补。在本发明中适宜的核酸探针分子至少是部分单链的，更适宜的是，至少与已知存在或可能存在的核酸分子相互补的核酸探针分子的一部分是以单链状态存在的。双链核酸分子可以被转化为单链或部分单链状态，以用作探针。例如对双链分子进行变性，或者用核酸酶或聚合酶对双链核酸分子进行处理。比较适合的是，当核酸探针分子或其部分处于单链状态时，核酸探针分子中的至少一个核苷键是对核酸酶敏感的，但是当核酸探针分子处于双链状态时，却又能抵抗核酸酶试剂的切割，例如当与一个部分互补或至少部分基本互补的核酸分子杂交时。

本发明中的核酸探针分子可以与本发明中的固定核酸分子至少部分互补或至少部分基本互补。在一些本发明的首选实施方案，如图 1A, 2, 3, 4, 5, 7A 和 7B 中所表示的，一个或多个核酸分子可以与待测核酸分子中已知存在或可能存在的核酸分子至少部分互补或



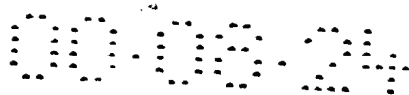
} 8

至少部分基本互补。并可以与一个或多个固定的核酸分子至少部分互补或部分基本互补。在这些实施方案中，与待测核酸分子中已知存在或可能存在的核酸分子互补或基本互补的核酸探针分子的一部分也可以与一种本发明中的固定核酸分子互补或基本互补。

在本发明的其它实施方案中，如图 1B，6A 和 6B 所示，探针 DNA 分子与待测核酸分子中存在的或可能存在的至少一种核酸分子部分互补或部分基本互补，同时与一种或多种本发明中的固定的核酸分子至少部分地一致或部分基本一致。在这些实施方案中，与已知存在或可能存在的核酸分子互补或基本互补的核酸分子中的至少一部分也可与本发明中的固定的核酸分子至少部分一致或基本一致。

在本发明针对于突变或 SNP 检测的优化实施方案中，如图 6A 所示，一个或多个探针核酸分子可以与一个或多个固定的核酸分子部分一致或部分基本一致，并与待测核酸群体中存在的或可能存在的核酸分子至少部分互补或部分基本互补。在这些实施方案中，至少与待测核酸群体中存在的或可能存在的核酸分子互补或基本互补的核酸探针分子的一部分也可以与固定的核酸分子一致或基本一致。并且，至少与待测核酸群体中存在的或可能存在的核酸分子互补或基本互补的核酸探针分子的一部分不与固定的核酸分子一致或基本一致。最好那些与固定的核酸分子一致或基本一致的核酸探针分子中的部分和那些与固定的核酸分子不一致或基本不一致的核酸探针分子中的部分是相邻的。最好一致与不一致部分的界线是已知的或可能存在的突变或是 SNP 位点。

在本发明针对突变或 SNP 检测的另一个优化实施方案中，如图 6B 所示，本发明中的核酸探针分子的一部分可以与一种或多种固定的核酸分子完全相同或基本相同。一种或多种核酸探针分子可以与待测核酸群体中存在的或或是可能存在的核酸分子至少部分互补或部分基本互补，并与一种或多种固定的核酸分子至少部分相同，或至少部分基本相同。在这一实施方案中，至少一部分与待测核酸群体



中存在的或可能存在的核酸分子互补或基本互补的核酸探针分子也可以与固定的核酸分子一致或基本一致。

在这一实施方案中，核酸探针分子可以包含一个特异基团例如生物素，可以用于捕获耐受核酸酶探针—待测核酸混合物。这种捕获过程可以在柱中进行，例如一个填充了含抗生素蛋白基质的柱子。另外，捕获过程还可以用磁珠来完成，例如使用包被了抗生素蛋白或链霉抗生物素蛋白的磁珠。待测核酸分子可以从被捕获的化合物上洗脱下来，例如用低盐的缓冲液，以备于下一步与阵列的杂交。

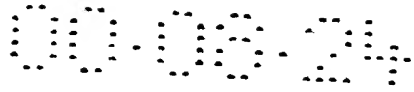
探针含有一个可用于结合的组分，例如但不仅仅限于生物素，或者含有一段核酸序列，这段序列具有抵抗核酸酶作用的能力。这段序列可以用于探针对序列的特异性捕获，也可以用于发明中的试图去捕获探针或抗核酸酶作用复合物的其它实施方案（例如，图 8 所示的实施方案）。

核酸探针分子可由已知的或技术领域中所发展的合成方法来制备。例如固相合成(参考文献, Oligonucleotide Synthesis, a practical approach(1984). Ed. M.J. Gait, IRL Press, "Oligonucleotides and Analogues, A Practical approach(1991) Ed.. F. Eckstein, IRL Press, Martin(1995) *Helv. Chim. Acta*, 78:486-504; Beaucage and Iyer(1992) *Tetrahedron* 48:2223-2311; and Beaucage and Iyer(1993) *Tetrahedron* 49:6123-6194)。另外, 核酸探针可以用反转录酶由 RNA 反转录制备, 例如, 但并不仅仅限于此, Molony 鼠白血病病毒反转录酶或禽成髓细胞瘤病毒反转录酶或其衍生物, 或者通过应用聚合酶从 DNA 模板合成 RNA 的方法, 聚合酶如 T7 RNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶、或其它 RNA 聚合酶, 这些酶都是在本领域中被熟知的。核酸探针还可以用 DNA 聚合酶由 DNA 模板合成以制备。DNA 聚合酶有(但并不仅仅限于此), DNA 聚合酶 I、DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段、Taq DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶或者 T4 DNA 聚合酶。用于合成 DNA 或 RNA 核酸探针分子的 DNA 模板可以在一种构建的体系

中，如质粒，或可以是由有机体中分离的自然存在的 DNA。核酸探针分子还可以通过自然存在的 DNA 或 RNA 的断裂来获得，例如从有机体中分离 DNA 并打碎或以限制性内切酶或核酸酶消化。由有机体或样品中分离的 DNA 或 RNA，无论是用于核酸探针分子或作为模板去合成核酸探针分子都要经过高度纯化或部分纯化。由有机体中分离的 DNA 或 RNA 的全部或部分可以用作固定核酸探针分子，或用作模板合成核酸探针分子。

一个核酸探针分子可以包括一个任意的可检测的标记。首选的标记包括荧光染料，如 Cy-3 和 Cy-5、荧光素、罗丹明、7-氨基-4-甲基香豆素、丹磺酰氯、Hoescht 33258、R-藻红素、量子红 (TM)、德克萨斯红、绿色荧光蛋白 (GFP)，或其它已知的或在本领域应用的荧光标记。另外，本发明中的核酸探针可以用放射性同位素标记，如 ^{35}P ， ^{35}S ， ^3H ， ^{32}P ， ^{125}I 或 ^{131}I 。其它可与本发明中的探针结合的可检测标记还包括可以被其它能产生可检测信号的分子所检测的特异性结合基团，例如生物素。那些在适宜底物存在下能产生可检测信号的酶也可以作为标记，例如(但不仅限于此)：碱性磷酸酶，荧光素酶，辣根过氧化物酶以及脲酶。标记还可以包括大分子量的修饰碱基，有助于通过质谱仪区分核酸分子。

这些标记可以在合成过程中固定于核苷酸上或与核苷酸结合，这些核苷酸是与核酸探针分子结合的。标记也可以在合成后固定到寡核苷酸上。标记寡核苷酸的方法是在本领域内广为人知的。例如，Sinha and Striepeke, "Oligonucleotides with Reporter Groups Attached to the 5' Terminal" in *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, ed, IRL Oxford, 1991, Siha and Cook, *Nucleic Acids Res*, 1998 16:2659; Hevgland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc. Eugene, Or(1992) 20, Thiesen, et. Al, *Tetrahedron Letters*(1992)



33:3036; Rosenthal and Tones, Nucleic Acid Res(1990) 18:3095, 41
Simith et al, Nucleic Acids Res(1995) 13:2399.

核酸分子的待测群体

核酸分子的待测可以包括 RNA, DNA, 或 DNA 和 RNA 的组合。DNA 或 RNA 可以分离自至少一个细胞, 至少一种组织, 至少一个生物样品, 至少一个生物体或至少一个环境样品。一个细胞可以是一个原核细胞或真核细胞, 可以是来源于生物体或体外培养的细胞。一种组织可以是一种器官或一种细胞类型, 包括皮肤、毛发和血液。一种生物样品可以是血液、精子、痰样、尿样、粪便样品、唾沫样品、活体取样、尸检样品, 或是有机样的培养物样品或采集物样品。环境样品包括土壤样品和水样品, 食物和饮料样品, 以及诸如织物, 器皿和化合材料的样品及其提取物。

核酸分子可以应用本领域中已知的方法从生物或环境样品中分离, 或根据组成核酸分子待测群体的材料的来源而定。

固定的核酸分子

固定的核酸分子是结合于固体载体的核酸分子。虽然对于此项并不是必须的, 但是固定的核酸分子最好是共价结合在固体载体上。

固定的核酸分子可以是 RNA、DNA, 或者由 RNA 和 DNA 组成的混合物。也包括骨架链由除了核糖或脱氧核糖之外的其他糖构成的核酸衍生物, 例如, 糖基是某种己糖。固定核酸分子还可以是肽核酸。

本发明中的固定核酸分子可以带有除核酸中天然存在的磷酸二酯键以外的其它核苷键。例如, 两个或更多的核苷可以由磷键相交接, 这些磷键包括磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、3' — (或 5') 脱氧—3' — (或 5') 硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、硒酸盐磷酸脂键、3' — (或 5') 脱氧磷脂键、硼化磷酸键、3' — (或 5') 脱氧—3' — (或 5') 氨基五磷酰氨键、氢化磷酸酯键、甲基磷酸酯键、硼化磷酸酯键、亚磷酰氨键、甲基或芳香基磷酸酯键和磷酸三酯键磷

化键。本发明的固定核酸分子的两个或多个核苷亚基可以由以下键相连接：碳酸酯键(carbonate)、氨基甲酸酯键(carbamate)、甲硅烷基键(silyl)、硫键(sulfur)、磺酸酯键(sulfonate)、磺胺键(sulfonamide)、缩醛键(formacetal)、硫代缩醛键(thioformacetal)、亚氨甲基键(methylimino)或 methylenedimethylhydrazo。本发明中的固定核酸分子可以含有至少一个抗核酸酶的键，例如但不仅仅局限于此，如一个或多个硫化磷酸酯键、甲基磷酸酯键或硼化磷酸键。

固定核酸分子可以含有自然或非自然存在的碱基或核苷，例如，腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶，以及次黄苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘧啶、6-甲基和其它腺嘌呤的烷基衍生物、2-丙基和其它腺嘌呤及鸟嘌呤的烷基衍生物、5-卤素尿嘧啶和胞嘧啶、5-propynyl 尿嘧啶和胞嘧啶、6-氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶（假尿嘧啶）、4-硫尿嘧啶、8-卤素氨基（巯基、硫代烷基、羟基和其它 8 位取代）腺嘌呤及鸟嘌呤、5-三氟甲基和其它 5 位取代尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤，其它的嘌呤和嘧啶包括在那些在美国专利 No.3, 687, 808 中公开的和《聚合体科学和工程简明百科全书》(1990) Kroschwitz, J.I ed., John Wiley and Sons, 858-859 页中公开的和由 Englisch et al.(1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613 中公开的。

本发明中的核酸探针分子可以为任何长度，但是适宜的长度为 5 到 500 核苷亚基，更适宜的长度为 10 到 250 个核苷亚基，最适宜的长度为 20 到 100 个核苷亚基。

本发明中的固定核酸分子至少部分是单链的。本发明中的一个或多个固定核酸分子与本发明中的核酸探针分子相比，至少是部分互补，或部分基本互补，或部分相同，或部分基本相同。

固定核酸分子通过已知的或在本领域发展出方法来合成，比如是固相合成（例如，Oligonucleotide Synthesis, a practical approach(1984). Ed. M.J. Gait, IRL Press, "Oligonucleotides and Analogues, A

00-00-24

43

Practical approach(1991) Ed.. F. Eckstein, IRL Press, Martin(1995) Helv. Chim. Acton, 78:486-504; Beaucage and Iyer(1992) Tetrahedron 48:2223-2311; and Beaucage and Iyer(1993) Tetronedron 49:6123-6194)。另外, 固定核酸分子可以用反转录酶由 RNA 反转录制备, 例如, 但并不仅仅限于此, Molony 鼠白血病病毒反转录酶或禽成髓细胞瘤病毒反转录酶或其衍生物, 或者通过应用聚合酶从 DNA 模板合成 RNA 的方法, 聚合酶如 T7 RNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶、或其它 RNA 聚合酶, 这些酶都是在本领域中被熟知的。固定核酸分子还可以用 DNA 聚合酶由 DNA 模板合成以制备。DNA 聚合酶有(但不仅仅限于此), DNA 聚合酶 I、DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段、Taq DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶或者 T4 DNA 聚合酶。用于合成 DNA 或 RNA 固定核酸分子的 DNA 模板可以在一种构建的体系中, 如质粒, 或可以是由有机体中分离的自然存在的 DNA。固定核酸分子还可以通过自然存在的 DNA 或 RNA 的断裂来获得, 例如从有机体中分离 DNA 并打碎或以限制性内切酶或核酸酶消化。由有机体或样品中分离的 DNA 或 RNA, 无论是用于固定核酸分子或作为模板去合成核酸探针分子都要经过高度纯化或部分纯化。由有机体中分离的 DNA 或 RNA 的全部或部分可以用作固定核酸探针分子, 或用作模板合成核酸探针分子。

一个固定核酸分子可以包括一个任意的可检测的标记。首选的标记包括荧光染料, 如 Cy-3 和 Cy-5、荧光素、罗丹明、7-氨基-4-甲基香豆素、丹磺酰氯、Hoescht 33258、R-藻红素、量子红 (TM)、德克萨斯红、绿色荧光蛋白 (GFP), 或其它已知的或在本领域应用的荧光标记。另外, 本发明中的固定核酸可以用放射性同位素标记, 如 ^{35}P , ^{35}S , ^3H , ^{32}P , ^{125}I 或 ^{131}I 。其它可与本发明中的固定核酸结合的可检测标记还包括可以被其它能产生可检测信号的分子所检测的特异性结合基团, 例如生物素。那些在适宜底物存在下能产生可检测信号的酶也可以作为标记, 例如(但不仅仅限于此): 碱性磷酸酶, 荧

000004
u4

光素酶，辣根过氧化物酶以及脲酶。标记还可以包括大分子量的修饰碱基，有助于通过质谱仪区分核酸分子。

这些标记可以在合成过程中固定于核苷酸上或与核苷酸结合，这些核苷酸是与核酸探针分子结合的。标记也可以在合成后固定到寡核苷酸上。标记寡核苷酸的方法是在本领域内广为人知的。例如，Sinha and Striepeke, "Oligonucleotides with Reporter Groups Attached to the 5' Terminal" in *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, ed, IRL Oxford, 1991, Siha and Cook, *Nucleic Acids Res*, 1998 16:2659; Hevgland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc. Eugene, Or(1992) 20, Thiesen, et. Al, *Tertrahedron Letters*(1992) 33:3036; Rosenthal and Tones, *Nucleic Acid Res*(1990) 18:3095, Simith et al, *Nucleic Acids Res*(1995) 13:2399.

核酸分子可以通过简单的核酸溶液点样的方法来固定于固体载体，如尼龙膜、硝酸纤维素膜、聚碳酸酯、聚苯乙烯或其它可塑固体表面。一种固体载体或一个或多个其结合物，包括固体载体的前体，可以被浸入一种或多种核酸分子的溶液中，以使核酸分子吸附在材料的内部或表面。固体载体接着被干燥并加热以使核酸固定于固体载体上。

表面带有共价结合的氨基的芯片已经商品化 (Nunc, Naperville, il), 并且核酸可以用碳二酰亚胺结合在这些芯片上，例如以 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)-碳二亚胺作缩合剂。

本发明中的固定的核酸分子可以以 3' 突出的方式固定于载体上，此时，核酸是以 5' 末端固定于载体上，或以一个连接臂固定于载体上。本发明中核酸分子与固体载体的共价接合可以通过一个反应来完成，这一反应发生于固体载体的反应位点或结合部与固定的核酸分子上的反应位点或另一结合部位之间发生的，或者可以由连接臂来完成，以使两种组合部分反应而形成共价结合。多种固化功能基

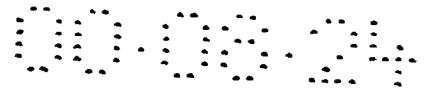


固体载体

本发明中的固体载体是一种固体材料，其表面可用于分子、化合物、细胞或其他实体的固定。固体载体可以是一种膜，例如，尼龙膜或硝酸纤维素膜，或者是一个碟形或盘形物，也可以由玻璃、陶瓷、金属或塑料组成，例如，96孔板，它可以由聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯或聚异质同晶体构成。固体载体可以是一种颗粒或由玻璃组成的珠体，或由一种或多种塑料或多聚物组成，例如，聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素或葡聚糖，也可以是金属材料，特别是顺磁离子金属，例如铁。

本发明中比较合适的固体载体为一种具有平滑表面的芯片或阵列，可以由玻璃、硅、尼龙、多聚体、塑料、陶瓷或金属组成。核酸分子固定于表面，这种固定的核酸分子与已知基因或未知基因（例如 ESTs）至少部分相同或至少部分互补。这些固定的核酸分子被排列于芯片的已知位点，这样阳性杂交点可以与待测核酸样品相同生理来源的特定基因的表达相关联。

本领域中有许多不同的芯片结构和制作的方法，在以下专利中曾公开过，美国专利：5, 445, 934; 5, 532, 128; 5, 556, 752; 5, 242, 974; 5, 384, 261; 5, 405, 783; 5, 412, 087; 5, 424, 186; 5, 429, 807; 5, 436, 327; 5, 472, 672; 5, 527, 681; 5, 529, 756; 5, 545, 531; 5, 554, 501; 5, 561, 071; 5, 571, 639; 5, 593, 839; 5, 599,



695; 5, 624, 711; 5, 658, 734;和 5, 700, 637;在这里, 这些专利公开的内容也可以作为我们所参考的文献。

ub

本发明中的另一种适宜的固体载体是一个球形或带有凹凸表面的颗粒, 可以由玻璃、多聚体(例如, 但并不仅仅限于此, 聚丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或塑料)、陶瓷或金属。核酸分子固定于这些颗粒上, 这些颗粒是多孔的或致密的。这些颗粒的用途可以是, 例如, 通过杂交捕获待测核酸分子或探针核酸分子。

探针与待测核酸分子的杂交

本发明的方法包括一种或多种核酸探针分子与待测核酸分子群的杂交。如果待测核酸分子是由双链 DNA 组成, 或包含双链 DNA 区域, 则在杂交前最好先转变为单链状态以促进其与核酸探针分子的杂交。

探针与待测核酸分子的杂交反应可以在有利于互补的、部分互补的、基本互补的、或部分基本互补的分子间的杂交的条件下的溶液中进行。杂交条件如杂交温度、盐浓度、如甲酸胺等变性化合物的浓度, 可以调到适合各种互补程度的核酸分子的杂交程度。有关杂交条件的讨论可以在 New York 出版公司, 1992 出版的由 John Wiley & Sons 编著的分子生物学简明手册中 Ausubel 等 (1998) 的文章中找到, 也可以在 1989 年冷泉港出版的实验室操作手册---DNA 克隆中 Sambrook et al 的文章中找到。在 New York 出版社出版的 Elsevier 的书---与核酸探针的杂交的第一和第二部分以及在分子生物学操作规程网址 listeria.nwfsc.noaa.gov/protocols.html 中也对杂交条件进行了描述。

在有利于待测的至少部分互补或基本互补的核酸分子与核酸探针杂交的条件下让二者进行反应, 得到探针与待测核酸分子的混和物。该混合物包括单链、双链的核酸分子, 以及部分单链部分双链的核酸分子。

用核酸酶解活性处理:

以上得到的混合物可以用一种或多种核酸酶解活性物质进行处理。本专利中的核酸酶解活性物包括化学裂解试剂，如四氧化锇、过氧化氢、羟胺、高锰酸等，也可以是酶，如核酸酶。首选的核酸酶包括单链特异性核酸酶，如核酸酶 S1，绿豆核酸酶，核糖核酸酶 T1、核糖核酸酶 A 或核糖核酸酶 H。

为了检测包含 RNA 的待测群体，Ausubel 等的《分子生物学简明手册》，John Wiley & Sons, New York, 1992, 4.6-4.7 单元, 4-14 页到 4-20 页中描述了核酸保护条件。另外，有关核酸保护条件的实用性指导可以参考 Ambion 有限公司，Austin 公司，Tex 公司的 2000 产品目录；Walmsely 和 Patient 的“用 S1 核酸酶保护实验定量和定性地分析体外基因表达”，Mol. Biotechnol. 1: 265-275, 1994; Lau 等的 "Critical Assessment of the RNase Protection Assay as a Means of Determining Exon Sizes," Anal. Biochem. 209: 360-366, 1993; Haines and Gillispie, "RNA Abundance Measured by a Lysate RNase Protection Assay," Biotechniques 12: 736-741, 1992; and Strauss and Jacobowitz, "Quantitative Measurement of Calretinin and Beta-Actin mRNA," Brain Res. Mol. Brain Res. 20: 229-239, 1993。

用具核酸酶解活性的物质处理探针与待测核酸的混合物以除去其中对核酸酶解活性敏感的核酸分子，得到不被核酸降解的核酸分子。在本发明中需用核酸酶解活性物质除去探针与待测核酸的混合物中的单链核酸和核酸的单链区域，得到不被核酸酶降解的双链核酸分子。但是本发明同时也考虑到那些因其他原因而非因为其为双链或单链而能耐受核酸酶解的核酸分子，例如某些特殊核酸分子因含有一个或多个抗核酸酶解活性的基团或化学键而使其具有抗核酸酶解活性的能力。

在本专利的一些部分，需要扩增经核酸酶处理后的核酸分子。例如检测污染物或病原体。DNA 的扩增技术是本领域内被熟知的技术。RNA 的扩增技术也是，且一般取决于用逆转录酶进行的第一条链

cDNA 的合成。最好需扩增的模板是线性的或基本是线性的，一般优先扩增其中一条单链，且最好这条单链能与本发明中的固定核酸分子至少部分互补或部分基本互补。通过用一种或多种具有核酸酶解活性的物质处理探针与待测核酸群体的混合物，得到能耐受核酸酶解的核酸分子后，一般要进行核酸酶解活性物质的抑制或去除处理。这样的处理方法例如加热核酸分子混合物，也可以加试剂，例如：去污剂或螯合剂如 EDTA，然后这些核酸分子就可以直接用于下一步反应。当然，最好先用试剂把这些核酸分子变为单链形式，包括(但不仅仅限于)高温、高 pH、使用变性剂或核酸酶。例如，在某些步骤中使用第二种核酸酶处理探针核酸分子或其片断或待测核酸分子片断使其变为单链形式，以便于和固定在固体载体上的固定核酸分子杂交。通过对所使用的核酸酶的选择，可以降解核酸分子的某一条特定的单链，保留需要与该固体载体上的固定核酸分子杂交的单链。例如，当至少一种探针与一种或多种固定核酸分子至少部分互补或至少部分基本互补，探针由 DNA 组成而待测核酸分子是 RNA 时，可以通过不含脱氧核糖核酸酶的核糖核酸酶如核糖核酸酶 H 来处理探针和待测核酸分子混合物使其变为单链。

固体载体上的分子杂交

与阵列相接触的所有抗核酸酶解活性的核酸分子或其单链核酸部分，在适宜的核酸杂交条件下，发生杂交形成固定核酸分子—能耐受核酸酶解的核酸分子复合物。合适的杂交条件在本领域内被熟知，在 Maniatis 等，supra 和 WO 95/21944 中有综述性的总结。这些杂交条件的改变，如高度或中度严格的杂交条件，从而得到预期的特异性杂交结果。例如，低特异条件可以是 50℃、6×SSC(0.9M NaCl/0.09M 柠檬酸钠)，而特异条件则是 50℃或更高、0.1×SSC(15mM NaCl/1.5mM 柠檬酸钠)。在许多情况下，在与阵列相接触的能耐受核酸酶解的核酸分子中，要求包含有标记或未标记的已知含量的标准 DNA 分子，以便于在后续分析中用作标准。DNA 标

49

00-00-24

37

固定核酸分子与能耐受核酸酶酶解的分子进行杂交，通常发生的是能耐受核酸酶酶解的核酸分子的一部分与固定核酸分子杂交，这样在杂交复合体中，能耐受核酸酶酶解的核酸分子是以部分单链和部分双链的形式存在。这就使得在复合杂交体中未杂交的能耐受核酸酶酶解的分子的单链部分可以作为模板，而杂交部分的固定核酸分子可以用作引物，在聚合酶反应中，就可以延伸固定核酸分子/能耐受核酸酶酶解的核酸分子复合体中的固定核酸分子。相似的，通常发生的是固定核酸分子的一部分与能耐受核酸酶酶解的核酸分子杂交，杂交复合体中的固定核酸分子是部分单链和部分双链的，使得在杂交复合体中产生的这部分单链可当作模板，而双链部分的能耐受核酸酶酶解的核酸分子可作为引物，通过聚合酶反应，即可延伸能耐受核酸酶酶解的核酸分子。通过一种或多种酶，在一个或多个同时或依次进行的聚合酶反应，延伸杂交复合体中的固定核酸分子和能耐受核酸酶酶解的核酸分子，都在本发明范围之内。

这尤其适用于（特别是，但不仅仅限于，突变或 SNP 的检测）只延伸杂交复合体中一条核酸分子。可以用于延伸杂交复合体中能耐受核酸酶酶解的核酸分子，或是延伸固定核酸分子，但一般不同时延伸两条链。这里有多种方法可完成这一延伸反应，例如：第一种方法，固定核酸分子与核酸探针分子可以设计成在杂交形成复合体

后，只有其中一种分子能形成具有单链突出端的区域；第二种方法，固定核酸分子与探针核酸分子可以是不同种类的核酸分子，例如在杂交复合体中，一条链为 DNA，而另一条链为 RNA。这样，通过使用不同的酶，可以只特异的合成 DNA 或 RNA，而不是同时合成二者；第三种方法是在探针分子或固定核酸分子的 3'端进行不允许核酸延伸的修饰，例如但是不仅仅限于，使用双脱氧核苷修饰；第四种方法是，在杂交复合体中设计探针核酸或是固定核酸分子的末端序列，使得非突出端核酸的末端碱基与另一核酸分子的相应碱基不能配对。在这一位置缺乏精确的碱基配对可以阻止聚合酶对核酸链的延伸。

本发明应用的 DNA 聚合酶包括，但不仅仅限于，DNA 聚合酶 I、klenow 片段、T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶以及反转录酶。聚合酶反应中应用的核苷酸，至少一种带有标记可以用于检测。作为标记的可以是酶、特异结合物、放射性同位素或荧光素。首选使用的是 ^{33}P 和荧光素，如 Cy3 和 Cy5。其余的试剂，如缓冲液、盐等，按照酶促反应最佳条件使用。掺入标记核苷酸的聚合酶反应温度依据所用的酶及其活性和特异性的要求来确定。

该应用（如为得到基因表达图谱，对固体载体上杂交复合体进行标记）的突出特点是每一个特定标记杂交能产生相同强度的杂交信号。所有的四种核苷酸都可进行标记，在阵列杂交复合体中核酸需延伸的碱基数目都是相同的。在阵列所有位点上固定核酸分子与探针杂交形成复合体时，没有发生配对的碱基数目都是相同的，然后可以由被标记的核苷酸来填充。

在固体载体上对杂交复合体进行标记和定向检测突变及 SNP 的应用上（如图 6A、6B 所示），固定核酸分子在非固定的 3'端包含有突变位点或 SNPs，在能耐受核酸酶酶解的核酸分子中包含的突变位点或 SNPs 则不在其末端。二者相杂交得到的复合体包括双链部分和单链部分，在双链部分的末端是已知的或可能存在的突变位点或 SNP

位点。这一位点就是聚合酶合成起始的位点。如果在突变或 SNPs 位点上，固定分子能与能耐受核酸酶酶解的核酸分子发生碱基配对，标记的核苷酸就能合成上去。但是，如果它们不能互补配对，就不能用标记的核苷酸延伸。因此通过阵列位点标记的检测，即可在核酸群体中确定与该阵列位点相互补的突变或 SNP 序列，从而确定核酸群体中的突变或 SNP。

该应用中所有四种核苷酸都可用于标记，聚合酶反应顺利进行时能保证该标记被掺入到固定核酸分子和能耐受核酸酶酶解的核酸分子的复合体中。

在相关的应用中，待检测的群体可以是 RNA 或 DNA，探针分子与固定核酸分子至少部分相同或部分基本相同，或是至少部分互补或部分基本互补。固定核酸分子和能耐受核酸酶酶解的核酸分子形成的复合体可用一种或几种聚合酶进行延伸，使用一种或几种标记核苷酸进行标记。常用的固定核酸分子与能耐受核酸酶酶解的核酸分子的杂交，是能耐受核酸酶酶解的核酸分子与固定核酸分子的一部分相杂交，这样杂交后的固定核酸分子部分单链，部分双链。这样以杂交体中能耐受核酸酶酶解的核酸分子作为引物，而固定在固体载体上的固定核酸分子的单链部分作为模板，在酶的作用下延伸杂交体中能耐受核酸酶酶解的核酸分子。使用的 DNA 聚合酶包括，但不仅仅限于，DNA 聚合酶 I、klenow 片段、T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶以及反转录酶。

本发明重要的特征是能耐受核酸酶酶解的核酸分子包含的突变位点或 SNPs 并不在末端，固定核酸分子未固定的 3'末端恰好位于突变或 SNP 位点之前。在固体载体上，能耐受核酸酶酶解的核酸分子与固定核酸分子的杂交，使得杂交后的能耐受核酸酶酶解的核酸分子既有双链部分又有单链部分，双链部分的末端在靠近存在或可能存在的突变或 SNP 位点处。在突变或 SNP 处掺入带有标记的终止核苷酸，可以确定突变位点或 SNP 位点序列。聚合反应中应用的终止核

核苷酸例如双脱氧核苷酸，至少一种要进行标记。终止核苷酸不允许其他的核苷酸继续在其后发生合成，至少要对一种终止核苷酸进行标记，但最好对四种不同的核苷酸都进行各异的标记。作为标记的可以是酶、特异结合物、放射性同位素或荧光素，通常使用的是荧光素，如 Cy3 和 Cy5。其他试剂，如缓冲液、盐等的使用可以优化聚合酶的反应。

末端标记探针的应用

本发明的另一个应用，在图 7A、7B 所示，所用的探针包含一个突变或 SNP，并至少在一端进行标记。而标记的终止核苷酸却在突变或 SNP 位点上。此应用中核酸探针至少部分互补或基本互补于一种或多种固定核酸分子。待测的核酸分子群体可以是 DNA，但常用的是 RNA。待测的核酸群体与探针分子杂交后，用单链特异的核酸酶处理，除去未杂交的单链核酸分子，包含未与已知或可能存在突变或 SNP 位点相杂交的探针分子的末端标记核苷酸。然后将杂交体与固体载体上的固定核酸分子相杂交，只有与已知或可能存在突变或 SNPs 的末端核苷酸相互补的探针分子，才能在阵列上产生杂交信号。在这里的应用中，可以有一到四种探针，末端各有不同标记的核苷酸，可用于不同的阵列杂交。

信号核酸分子与固体载体上杂交复合体的杂交

在如图 4、图 8 中所示的本发明的具体实例中，一个或多个信号核酸分子能够与固定核酸分子一能耐受核酸酶解活性的核酸分子复合物杂交。在这些例子中，进行的是一种"三明治"式的杂交，即：能耐受核酸酶解活性的核酸分子杂交到固定核酸分子上，形成杂交复合体，而信号核酸分子又与复合体中的能耐受核酸酶酶解的核酸分子杂交。一种或多种信号核酸分子与至少一种探针核酸分子部分互补或部分基本互补，或至少是部分一致或部分基本一致。这样，至少一种能耐受核酸酶酶解的核酸分子的一部分与一种或多种信号核酸分子的一部分是部分互补或基本互补的。最好的情况是，能耐受

核酸酶酶解活性的核酸分子的部分区域不与固定核酸分子互补，而此区域至少与信号核酸分子的一部分互补。

信号核酸分子可以是 RNA、DNA，或者由 RNA 和 DNA 组成的混合物。也包括骨架链由除了核糖或脱氧核糖之外的其他糖构成的核酸衍生物，例如，糖基是某种己糖。信号核酸分子还可以是肽核酸。

本发明中的信号核酸分子可以带有除核酸中天然存在的磷酸二酯键以外的其它核苷键。例如，两个或更多的核苷可以由磷键相交接，这些磷键包括磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、3' — (或 5') 脱氧—3' — (或 5') 硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、硒酸盐磷酸酯键、3' — (或 5') 脱氧磷酸酯键、硼化磷酸键、3' — (或 5') 脱氧—3' — (或 5') 氨基五磷酰氨键、氢化磷酸酯键、甲基磷酸酯键、硼化磷酸酯键、亚磷酰氨键、甲基或芳香基磷酸酯键和磷酸三酯键磷化键。本发明的信号核酸分子的两个或多个核苷亚基可以由以下键相连接：碳酸酯键(carbonate)、氨基甲酸酯键(carbamate)、甲硅烷基键(silyl)、硫键(sulfur)、磺酸酯键(sulfonate)、磺胺键(sulfonamide)、缩醛键(formacetal)、硫代缩醛键(thioformacetal)、亚氮甲基键(methylinino)或 methylenedimethylhydrazo。本发明中的信号核酸分子可以含有至少一个抗核酸酶的键，例如但不仅仅局限于此，如一个或多个硫化磷酸酯键、甲基磷酸酯键或硼化磷酸键。

信号核酸分子可以含有自然或非自然存在的碱基或核苷，例如，腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶，以及次黄苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘧啶、6-甲基和其它腺嘌呤的烷基衍生物、2-丙基和其它腺嘌呤及鸟嘌呤的烷基衍生物、5-卤素尿嘧啶和胞嘧啶、5-propynyl 尿嘧啶和胞嘧啶、6-氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶（假尿嘧啶）、4-硫尿嘧啶、8-卤素氨基（巯基、硫代烷基、羟基和其它 8 位取代）腺嘌呤及鸟嘌呤、5-三氟甲基和其它 5 位取代尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤，其它的嘌呤和

嘧啶包括在那些在美国专利 No.3, 687, 808 中公开的和《聚合体科学和工程简明百科全书》(1990) Kroschwitz, J.I ed., John Wiley and Sons, 858-859 页中公开的和由 Englisch et al.(1991) *Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613 中公开的。

本发明的信号核酸分子可以是任意长度的, 但长度在 5-50 核苷之间较好, 较优长度在 10-250 核苷之间, 最优长度是 20-100 个核苷。

本发明的信号核酸分子至少应是部分单链分子。与能耐受核酸酶酶解的核酸分子互补的信号核酸分子至少部分是单链状态。双链核酸分子可以被转化成单链或部分单链状态, 以便利用。例如, 对双链核酸分子变性, 或用核酸酶、聚合酶处理。

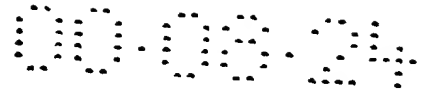
信号核酸分子可用已知的合成法获得, 比如是固相合成 (例如, *Oligonucleotide Synthesis, a practical approach*(1984). Ed. M.J. Gait, IRL Press, "Oligonucleotides and Analogues, A Practical approach(1991) Ed.. F. Eckstein, IRL Press, Martin(1995) *Helv. Chim. Acta*, 78:486-504; Beaucage and Iyer(1992) *Tetrahedron* 48:2223-2311; and Beaucage and Iyer(1993) *Tetrahedron* 49:6123-6194)。另外, 信号核酸分子可以用反转录酶由 RNA 的反转录过程来制备, 或者通过应用聚合酶从 DNA 模板合成 RNA 的方法, 聚合酶如 T7 RNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶, 或其它 RNA 聚合酶, 这些酶在本领域内都是被熟知的。信号核酸分子还可以用 DNA 聚合酶由 DNA 模板来制备。DNA 聚合酶例如但不仅仅限于此, DNA 聚合酶 I、Klenow 片段、Taq 酶、T7 DNA 聚合酶或者 T4 DNA 聚合酶。

信号核酸分子应包括可检测到的标记。被杂交到固体载体上的固定核酸/防核酸降解复合体上的一套信号核酸分子中的所有信号核酸分子应被标记至有相同的特异活性, 这样, 在筛选群体时, 信号核酸分子的检测才可以给出核酸序列所代表的数量信息。

优选的标记方法包括荧光法如使用 Cy-3 和 Cy-5、荧光素、罗丹明、7-氨基-4-甲基香豆素、丹磺酰氯、Hoescht 33258、R-藻红素、量子红 (TM)、德克萨斯红、绿色荧光蛋白 (GFP), 或其它已知的或在本领域应用的荧光标记。也可以用同位素标记, 如 ^{35}P , ^{35}S , ^3H , ^{32}P , ^{125}I 或 ^{131}I 。本发明中, 其他可检测标记包括可被其他分子检测以产生可检测信号的特异结合基团, 例如生物素。那些在适宜底物存在下能产生可检测信号的酶也可以作为标记, 例如但不仅仅限于此, 碱性磷酸酶、荧光素酶、辣根过氧化物酶以及脲酶。标记还可以包括大分子量的修饰碱基, 有助于通过质谱仪区分核酸分子。

这些标记可以在合成过程中固定于核苷酸上或与核苷酸结合, 这些核苷酸是与核酸探针分子结合的。标记也可以在合成后固定到寡核苷酸上。标记寡核苷酸的方法是在本领域内广为人知的。例如, Sinha and Striepeke, "Oligonucleotides with Reporter Groups Attached to the 5' Terminal" in *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, ed, IRL Oxford, 1991, Siha and Cook, *Nucleic Acids Res*, 1998 16:2659; Hevgland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc. Eugene, Or(1992) 20, Thiesen, et. Al, *Tetrahedron Letters*(1992) 33:3036; Rosenthal and Tones, *Nucleic Acid Res*(1990) 18:3095, Simith et al, *Nucleic Acids Res*(1995) 13:2399.

与阵列接触的信号核酸分子和探针核酸在适宜的核酸杂交条件下杂交。合适的杂交条件在本领域内被熟知, 在 Maniatis 等, *supra* 和 WO 95/21944 中有综述性的总结。这些杂交条件的改变, 如高度或中度严格的杂交条件, 从而得到预期的特异性杂交结果。例如, 低特异条件可以是 50°C 、 $6\times\text{SSC}$ ($0.9\text{M NaCl}/0.09\text{M}$ 柠檬酸钠), 而特异条件则是 50°C 或更高、 $0.1\times\text{SSC}$ ($15\text{mM NaCl}/1.5\text{mM}$ 柠檬酸钠)。



杂交完成之后，通过清洗可从固体载体上除去未杂交上的核酸分子。可以使用各种在本领域内被熟知的清洗液的配方与操作步骤进行清洗。

如在图 8 中所描述的，当信号核酸分子与在固体载体上的杂交复合体的杂交完成后，连接反应使得信号核酸分子共价结合到固定核酸分子上。在这过程中，固定核酸分子末端是已知的或可能存在的突变或 SNP 位点，同时，杂交复合体中的核酸分子中也包含已知的或可能存在的突变或 SNP 位点，但是并不位于末端。信号核酸分子的设计时就使其一个末端存在已知的或可能存在的 SNP 位点，这样当与能耐受核酸酶酶解的核酸分子杂交时，它紧紧相连于一个固定核酸分子。信号核酸分子只有当固定核酸分子和能耐受核酸酶酶解的核酸分子在已知的或预期的突变或 SNP 位点精确配对时才可以连接到固定核酸分子上。在本发明中所用的连接酶包括，但不仅仅限于，T4 DNA 连接酶、大肠杆菌连接酶、耐热 DNA 连接酶和 RNA 连接酶。

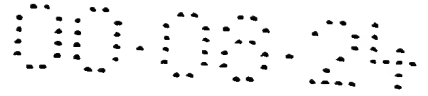
在连接反应完成后，进行严格清洗，较适宜的包括 0.1 M 的 NaOH，这样非共价结合的核酸分子都从固体载体上清洗出去。在这里，信号核酸分子最好含有可检测的标记。本发明中，在固体载体上的信号核酸分子的可检测标记的检测是建立在固定核酸分子和能耐受核酸酶酶解的核酸分子之间的序列的精确匹配之上的。

用核酸酶解活性处理在固体载体上的杂交复合物

在图 5 所示的另一种典型情况下，进行核酸酶解活性的进一步处理，它是在能耐受核酸酶酶解的核酸分子杂交到固定核酸分子上，形成复合体之后进行的。

在此条件下，固定核酸分子应包括可检测标记，也可以包括一个或多个耐核酸酶解活性的基团或化学键。

固定核酸分子的耐核酸酶解活性的部分最好位于核酸分子靠近固体载体的位置。这样，固定核酸分子的短片段（如 10 个核苷酸或更



小片段) 不会在单链状态下被具有核酸酶解活性物质所降解。当在单链状态下, 核酸探针分子中的核苷键应最少有一个对核酸酶解活性试剂敏感, 但在当探针和其它互补或是基本互补的核酸分子杂交形成双链时不敏感。在这里, 单链状态指的是存在一个或多个核苷酸, 不能和对应的核酸分子碱基配对, 但是在其它区域的碱基全都配对。被检测标记最好位于固定核酸分子的核酸酶解活性试剂敏感部位, 而不在临近固体载体处。

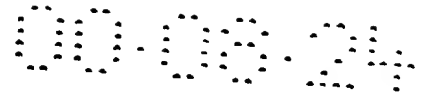
另外, 固定核酸分子可被间接连接到固体载体上, 如通过带有或不带有抗核酸酶解活性试剂部分的连接臂。当在单链状态下, 核酸探针分子中的核苷键应最少有一个对核酸酶解活性试剂敏感, 但在当探针和其它互补或是基本互补的核酸分子杂交形成双链时不敏感。被检测标记最好位于固定核酸分子的核酸酶解活性试剂敏感部位。

这样, 当能耐受核酸酶解的核酸分子和固体载体上的固定核酸分子杂交之后, 复合体用核酸酶解活性物质处理, 这样包括一个或多个可检测标记的固定核酸分子部分中没有与能耐受核酸酶解的核酸分子杂交的就被降解了, 标记随之从固体载体上释放下来。而被杂交上的标记被保留在固体载体上, 可以被以下介绍的方法检测到。

固体载体上的杂交复合体的检测

杂交复合体的检测可以使用多种方法, 包括, 但不仅仅限于, 荧光分光检测、分光吸收检测、闪烁计数检测、放射自显影、放射性同位素成像检测、发射光谱测量、质谱等等。

如果目标核酸上的标记不能被直接检测, 则固体载体上包括目标联接物及信号产生系统的其他成分可被利用。例如, 目的标记是生物素, 然后在适宜条件下用链霉抗生物素蛋白和阵列接触。在接触后, 没有结合的试剂将会被去掉, 比如是通过清洗。根据所使用的



信号产生系统，采用不同的清洗条件。所使用的方法和常见的信号产生系统相似。

58

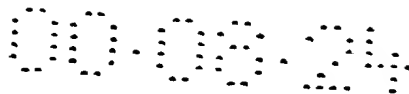
在杂交检测中，标记的强度、信号的数值不仅要被显示还要被定量测定。定量测定的方法是记录每个杂交点发出的信号，并与已知数目末端标记的目标分子发出的信号相比较，得到阵列特定位点杂交上的末端标记核酸拷贝数的相对值或绝对值。

通过杂交检测，可以确定和阵列接触的标记核酸样品的基因表达图谱的信息，并推断出待测样品所处的生理环境。通过基因图谱的分析可得到当前样品中有关核酸类型的信息，如与它相互补的基因类型，以及每个样品中特定核酸的拷贝数。从这些数据又能得到检测的核酸样品的生理环境的信息，如在组织、细胞中基因表达的类型，以及每个基因的表达水平，特别是基因表达的数量。当目标核酸来自不同来源时，通过比较杂交类型就可确定不同来源样品的差异。当固定在阵列上的核酸分子都对应着已知的基因时，对不同生理来源的样品的分析可以比较出特定基因表达上的差异。因此，本发明在基因差异表达方面有许多应用，利用此方法就可分析以下所列举（但不仅仅限于）的基因表达的差异，a)病变和正常组织，如肿瘤组织和正常组织，b)不同组织或亚组织类型。

比较两个待测群体的核酸分子的表达

本专利的一个应用领域是对两个待测群体的核酸分子的表达进行比较，待测群体最好是相关的，但也并非要求一定相关。例如，第一个待测群体可以是从小类癌变的细胞中抽提所得的 RNA，则第二个待测群体可以是从小类类型的但未癌变的细胞中抽提得到的 RNA。

方法包括：在有利于互补的核酸分子进行杂交的条件下，把一组至少一种核酸探针与一种待测核酸群体进行杂交，得到第一组探针—待测核酸群体混合物；同样条件下把另一组至少一种探针与待测核酸群体进行杂交，得到第二组探针—待测核酸群体混合物，然后用一种或多种核酸酶对这些混合物进行处理，以便使单链核酸分子



被消化掉，得到两组能耐受核酸酶酶解的核酸分子。然后，在有利于核酸分子进行杂交的条件下，把这两组能耐受核酸酶酶解的混合物分子与固定到固体载体上的一种或多种核酸分子进行杂交，就得到固定在载体上的核酸分子—能耐受核酸酶酶解的核酸分子复合物。然后就可鉴定一种或多种固体载体上的固定核酸分子或是这些核酸复合物中或一种或多种能耐受核酸酶酶解的核酸分子。

最好第一组和第二组核酸探针包括那些序列组成相同的核酸探针，但也并非一定如此。最好，两组核酸探针含有不同的标记，以便于区别。在此，第一组和第二组探针必须与固体载体上的一种或多种固定核酸分子能够部分互补，或至少部分能基本互补。例如，一组来自原初神经胶质细胞的 RNA 可以与用 Cy3 标记的探针进行杂交，而另一组来自恶性神经胶质细胞瘤活组织的 RNA 可以与第二组用 Cy5 标记的探针进行杂交。然后，用核酸酶对探针与待测核酸群体的混合物进行处理，则不被核酸酶消化的那些核酸分子将与 DNA 阵列上固定核酸分子进行杂交。通过用光学扫描就可以知道来自这两个群体的与固定到芯片上的核酸分子相关的基因的表达水平。

为了得到表达谱，待测对象最好是 RNA，这里 RNA 可以是总 RNA 或 mRNA。这些 RNA 最好是由至少一种细胞或组织提取得到的。RNA 的提取方法在本领域内是被熟知的（可参考，Ausubel et al. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons）当然，待测 RNA 群体也可以是扩增后得到的 RNA，或由体外由 DNA 模板转录所得。扩增 RNA 和体外转录 RNA 的方法是也是本领域内常见的技术。

如果是测定 DNA 群体，它可以是由 RNA 反转录得到的 cDNA，这些 cDNA 也可以是被扩增的。如果通过扩增的方法，DNA 最好是线性的，或基本是线性的扩增。

II 该核酸分子鉴别系统的试剂组合物

两个体外转录反应按如下程序进行，每个反应体系中加入 1 μ g 线性 pWPY001 DNA、相应的转录酶缓冲液、10 mM 二硫苏糖醇 (DTT)、0.5 mM rNTPs、100 单位核糖核酸酶抑制剂、40 单位 T7 RNA 或 SP6 RNA 聚合酶。于 38 度反应 2 小时，然后分别加入 5 μ l 不含核糖核酸酶的脱氧核糖核酸酶，达到每微克模板 DNA 对应一个单位的酶，37 度温育 15 分钟以消化模板 DNA。

再向每一反应体系中加入 350 μ l 含有新加入的 β -巯基乙醇（加样比例：10 μ l β -巯基乙醇加到 1 ml 缓冲液中）的高盐缓冲液（Qiagen, Valencia, CA）以纯化 RNA。再加入 250 μ l 乙醇，上下吸打几次混匀，加到装在收集管内的 Rneasy 微离心柱（Qiagen, Valencia, CA）中。收集柱一管于 8000 g 离心 15 秒。把 Rneasy 柱再置入一个新的收集管内。在柱中加入 500 μ l RPE 缓冲液（Qiagen, Valencia, CA），8000 g 再离心 15 秒以清洗柱子。再洗两次，每次都加入 500 μ l RPE 缓冲液，第一次 8000 g 离心 15 秒，第二次 13000 g 离心 2 分钟。把柱子再置入一新收集管，13000 g 离心 1 分钟。最后，把柱子移入另一新收集管，加入 30 μ l 不含核糖核酸酶的水加到柱子的膜上，8000 g 离心一分钟洗下用于核酸检测的 RNA。

B. 待测 RNA 群体与探针在溶液中的杂交及用核酸酶的处理

进行两个杂交实验，在每一个试验中，各将 2 μ l 含有 0.1 μ g 第一部分中合成的待测 RNA 群体中的一种 RNA，加到含有 5 nM TA₃₇ 的 1x 绿豆核酸酶缓冲液中。TA₃₇ 是一种 DNA 探针，它的序列是：5' - GAT GTT GGG TGG TTG TCC AAA AGA GCG TGC AGA GAT T-3'，它可以与第一部分中用 SP6 RNA 聚合酶合成的 RNA 的一部分进行杂交，它与第一部分中用 T7 RNA 聚合酶合成的核酸分子的一部分是相同的。这些 RNA 和 TA₃₇ 探针的终体积是 40 μ l，90 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟，然后在 50 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟进行杂交。

50℃温育后，向每一反应体系中加 12 单位的绿豆核酸酶，37℃温育 30 分钟，加入 EDTA 使终浓度达 10 毫摩尔以终止反应。得到的反应液含有不被核酸酶降解的核酸分子。在反应体系中加入 2 个单位的核糖核酸酶 H，37℃温育 15 分钟，降解与能耐受核酸酶酶解的核酸分子互补的 RNA 链。

b~

C. DNA 阵列的制备及其与能耐受核酸酶酶解的核酸分子的杂交
末端带氨基的寡核苷酸，“NH₂-TA₂₅”序列 NH₂—AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA A—3’，是人工合成的，它可与 TA₃₇ 的部分序列互补，因此所有 NH₂-TA₂₅ 序列都可与 TA₃₇ 互补，而只有部分 TA₃₇ 序列与 NH₂-TA₂₅ 互补，在 5’ 有 12 个碱基是不与 NH₂-TA₂₅ 互补的。

将 10 微摩尔的 NH₂-TA₂₅ 溶液点到表面已经被羧基修饰的玻璃片的区域上，把该玻片放入不透光的干燥箱里放置三天。然后洗涤玻片，先用 0.2% SDS 洗 2 分钟，再用水洗两次各 1 分钟，然后用 NaBH₄ 溶液（NaBH₄ 0.2 g 加到 80 ml 25% 的乙醇中）洗一次，最后用水洗 1 分钟。

22 μl 能耐受核酸酶酶解的核酸分子混合物 1（T7 聚合酶合成的 RNA 与探针混合）加到玻片 1 的点阵部分上，22 μl 能耐受核酸酶酶解的核酸分子混合物 2（SP6 聚合酶合成的 RNA 与探针混合）点到点阵玻片 2 的部分上，将盖玻片盖到玻片的点阵部分上，把玻片放到一个盒子里，扣紧盒子，90℃温育 10 分钟，50℃温育 60 分钟。然后用预热到 50℃的 1×SSC/0.1%SDS 溶液洗三分钟，然后再用预热到 50℃的 0.1× SSC/0.1% SDS 溶液洗三分钟，然后于室温用水洗三分钟。

为标记片子上的杂交混合物，须制备一种包括 1×Klenow 片断缓冲液（Promega, Madison, WI），dATP、dGTP 和 dTTP 各 83 微摩尔，66 微摩尔 Cy5-dCTP，5 单位 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片断的溶液，

83

64

四种具有氨基末端的寡核苷酸: $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{A}}$ 、 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{T}}$ 、 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{C}}$ 、 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{G}}$ 、序列信息分别为:

5' - $\text{NH}_2\text{-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA A-3'}$

5' - $\text{NH}_2\text{-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA T-3'}$

5' - $\text{NH}_2\text{-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA C-3'}$

5' - $\text{NH}_2\text{-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA G-3'}$

全部是人工合成的。 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{A}}$ 、 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{G}}$ 、 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{T}}$ 、 $\text{NH}_2\text{-S}_{25\text{C}}$ 是与待测 DNA 群体的 L_{45} 探针部分相同的, 且与探针 M_{37} 部分互补, 所以 $\text{NH}_2\text{-S}_{25}$ 的全部 25 个碱基中的 24 个是和待测 DNA 群体互补的 (除了 3' 末端的碱基在四种核苷中变化的之外)。

四种 $\text{NH}_2\text{-S}_{25}$ 的溶液各 10 μM 点到表面已经用羧基修饰的玻片的区域上, 在不透光的干燥的盒子里放三天。然后洗涤玻片, 先用 0.2% 的 SDS 洗 2 分钟, 再用水洗两次各 1 分钟, 然后用 NaBH_4 溶液 (NaBH_4 0.2 g 加到 80 ml 25% 的乙醇中) 洗一次, 最后用水洗 1 分钟。

22 μl 能耐受核酸酶酶解的核酸分子点到玻片的特定区域上, 将盖玻片盖到玻片的相应位置上, 把玻片放到一个盒子里, 扣紧盒子, 90 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 分钟, 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 分钟。然后用预热到 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 1 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗三分钟, 然后再用预热到 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.1 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗三分钟, 然后于室温用水洗三分钟。

为标记片子上的杂交混合物, 须制备一种包括 1 \times Taq 酶缓冲液, 各 50 μM 的 dATP, dGTP, 和 dTTP, 50 μM 的 Cy5-dCTP, 5 单位 Taq 聚合酶的溶液, 终体积 90 μl 。各取 22.5 μl 该溶液加到两玻片的相应位置上, 68 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 分钟。然后用 1 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗 10 分钟, 然后再用 0.1 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗 10 分钟, 然后用水洗 5 分钟。再用 1 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗 10 分钟, 再用 0.1 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗 10 分钟, 然后用水洗 10 分钟, 干燥片子。

D. 杂交信号的检测

按制造商提供的操作程序用 GSI Scanarray3000 扫描玻片，结果显示固定有核酸分子 5' -NH₂-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA A-3' 的区域有荧光信号，而固定有核酸分子 5' -NH₂-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA T-3'、5' -NH₂-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA C-3' 和 5' -NH₂-AAT CTC TGC ACG CTC TTT TGG ACA G-3' 的区域没有荧光信号。这说明只有以腺嘌呤 A 结尾的核酸分子能结合荧光标记，据此我们可以推断我们检测的核酸分子在那个位置上有一个互补的胸腺嘧啶 T。按这种方法就可检测所探查的核酸中的单核苷酸多态性序列。

所有出版物，包括在本专利申请书中提到的专利文件、科研文章，以及任何参考书，它们共同构成本发明的参考文献。

说明书附图

6b

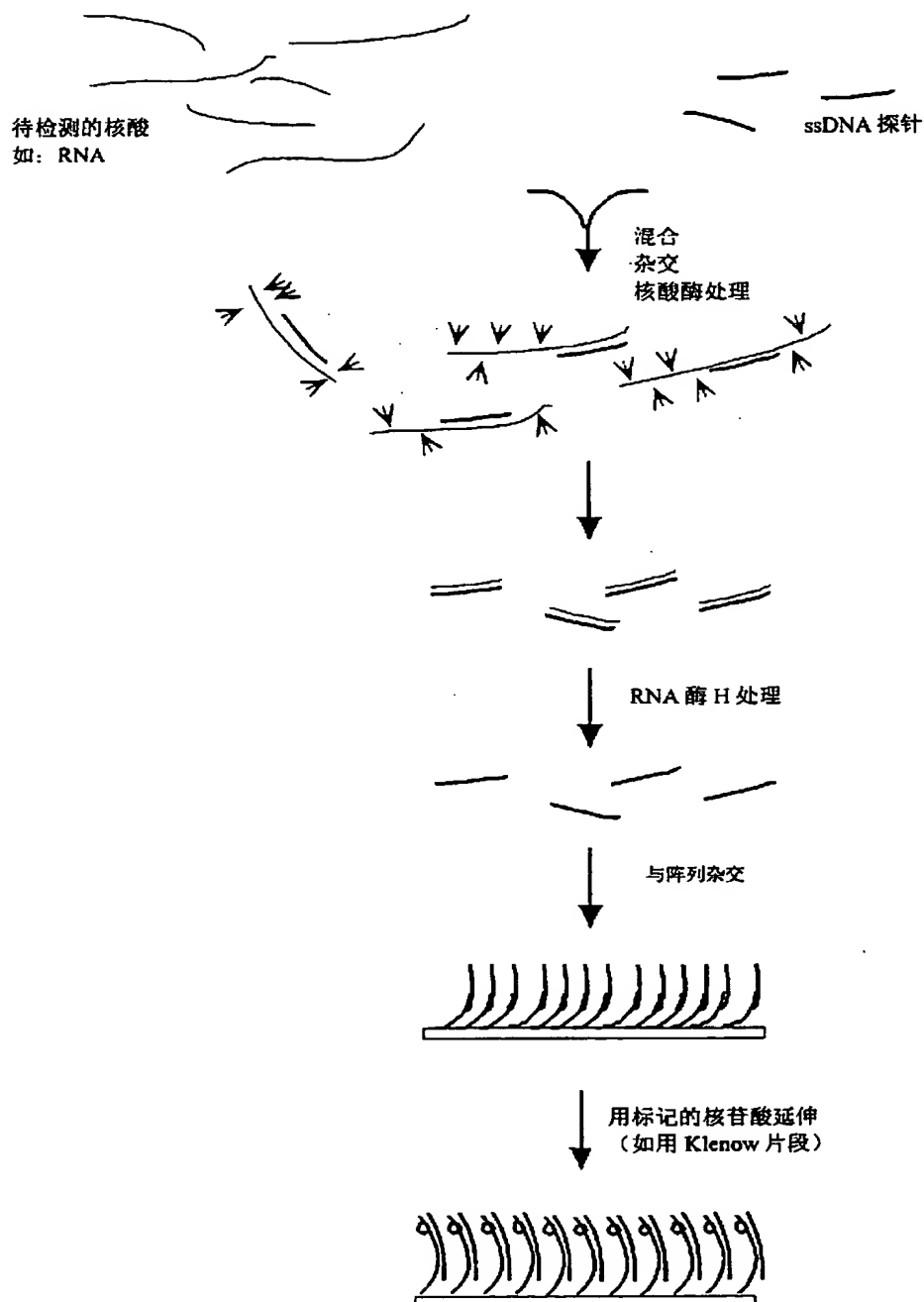


图 1A

00-08-24

67

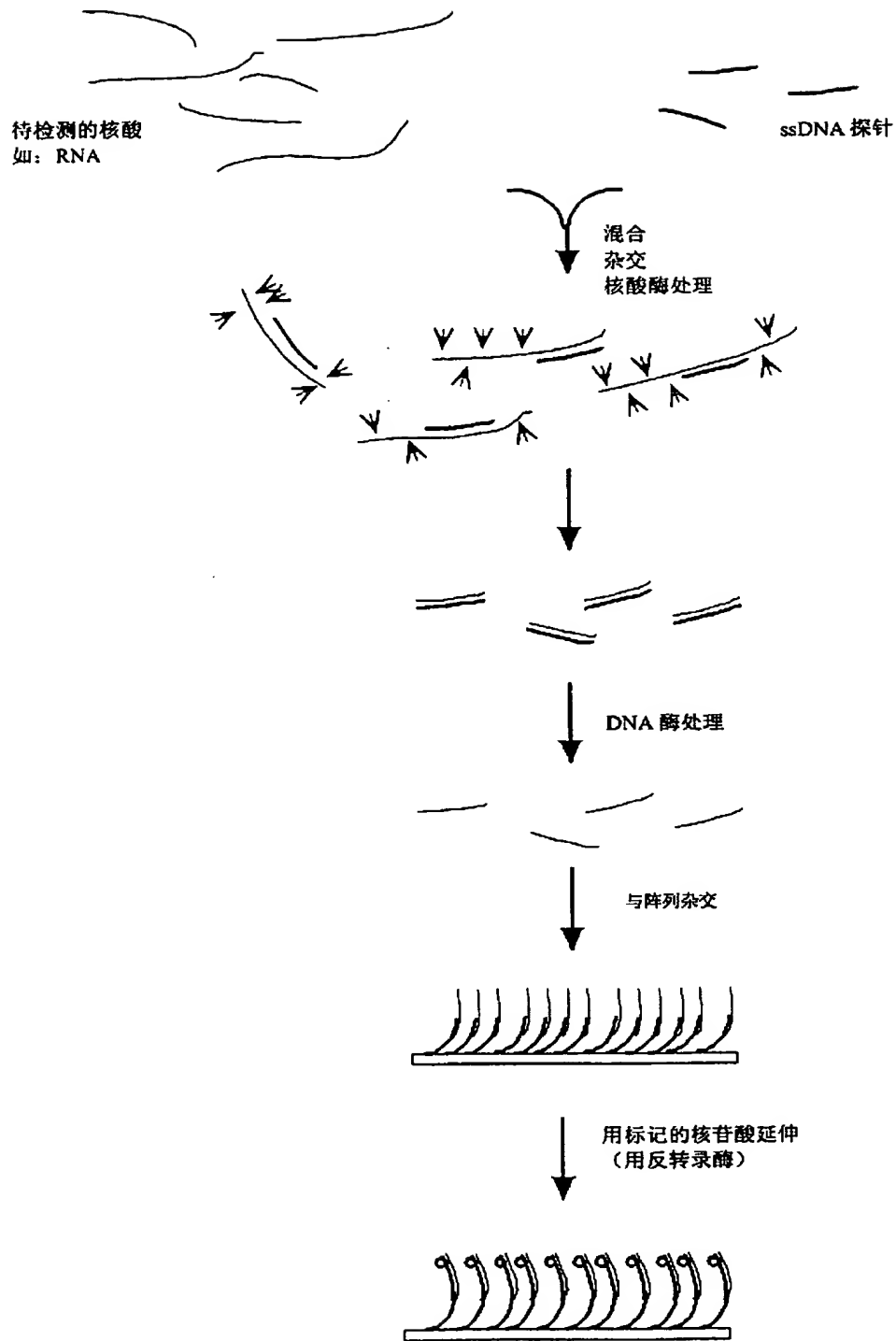


图 1B

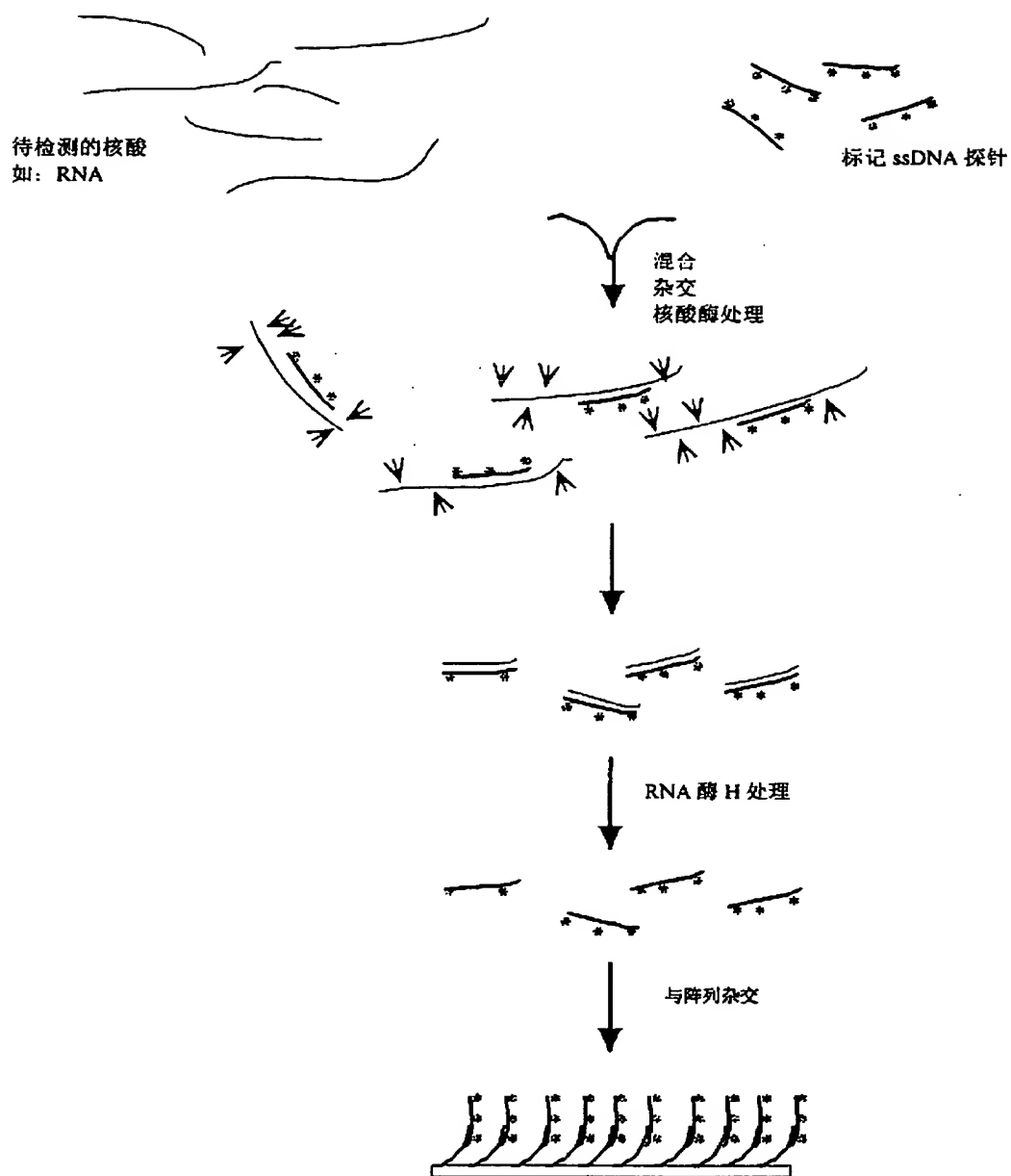


图 2

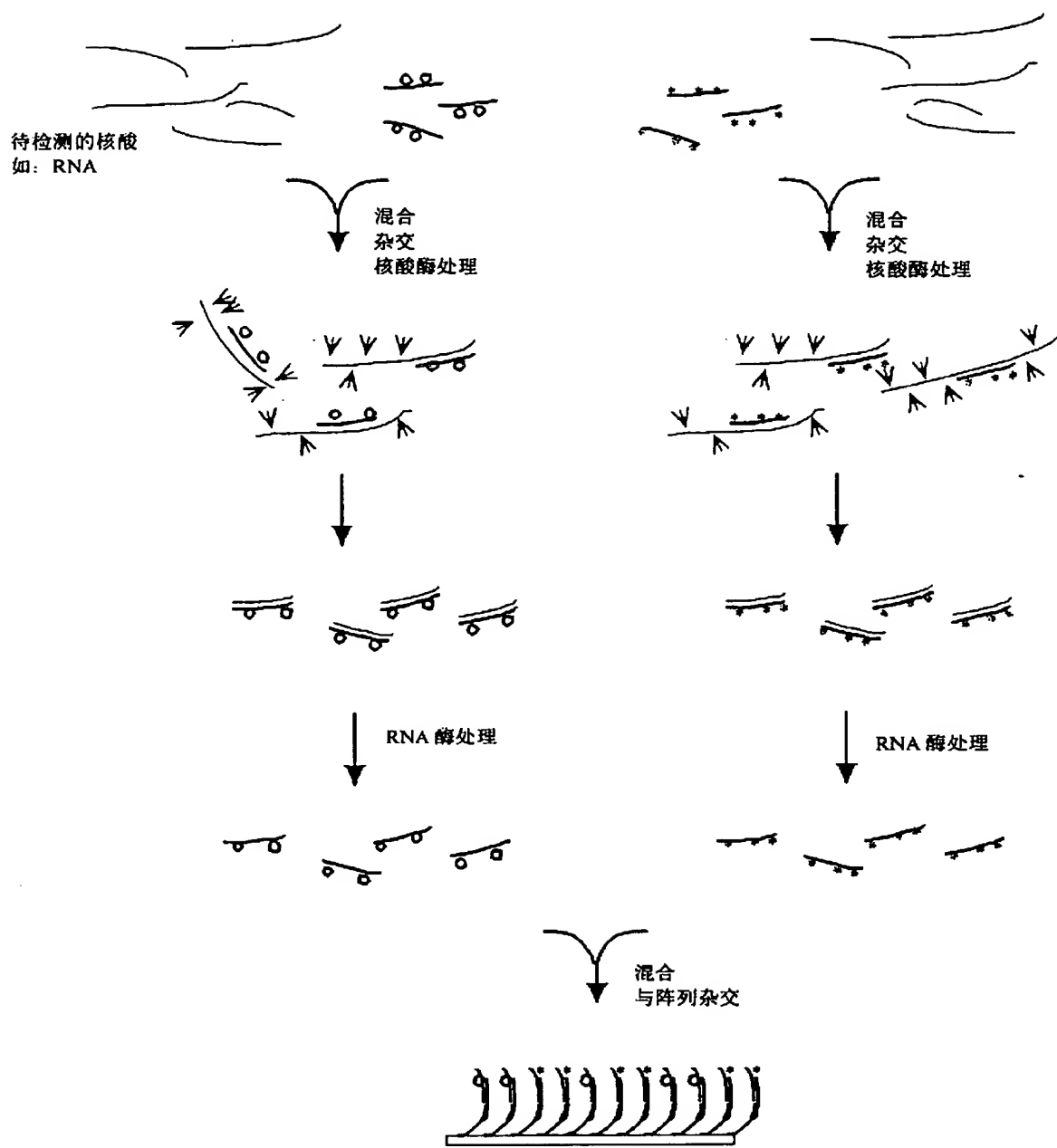


图 3

00.08.24

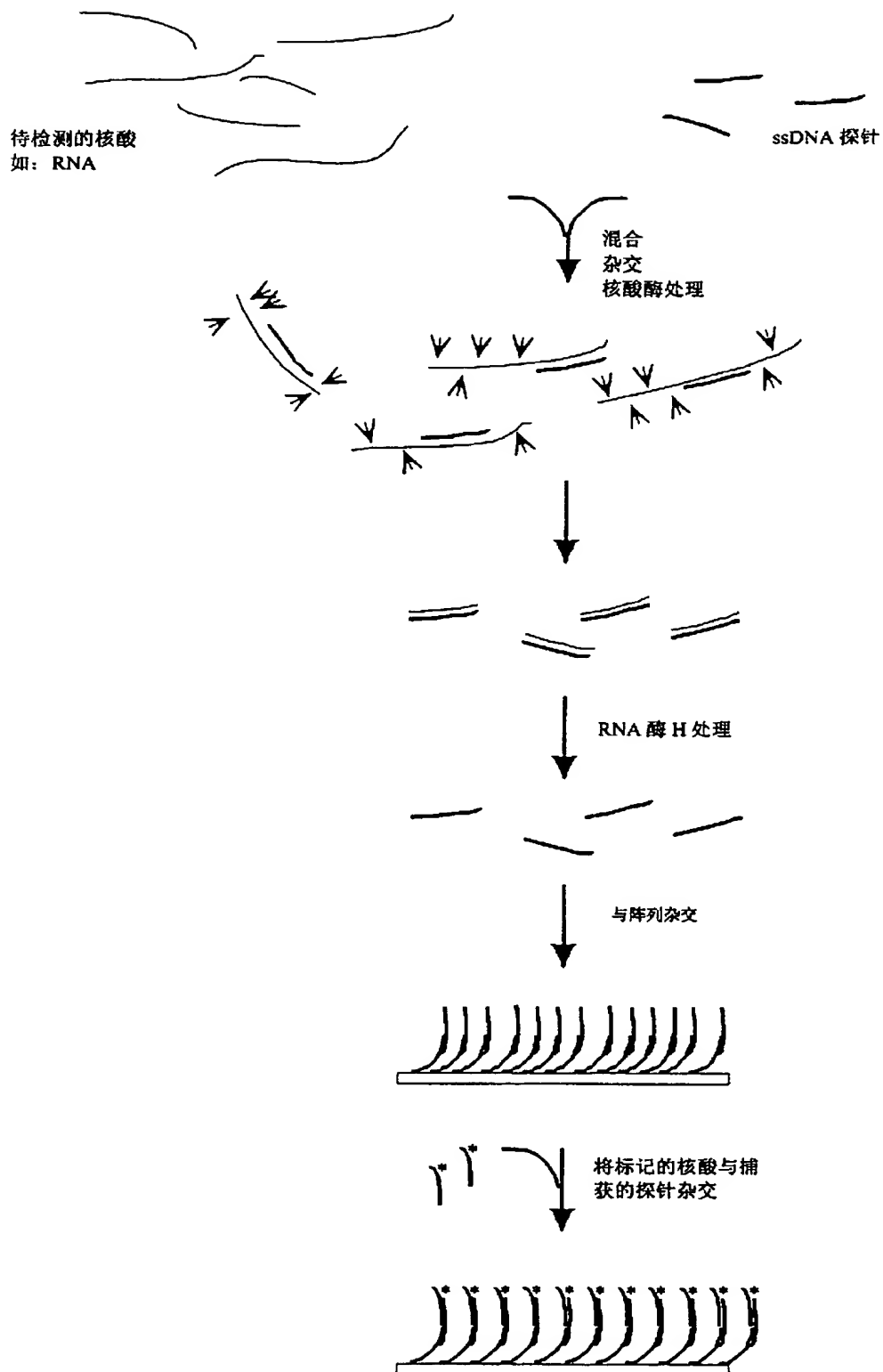


图 4

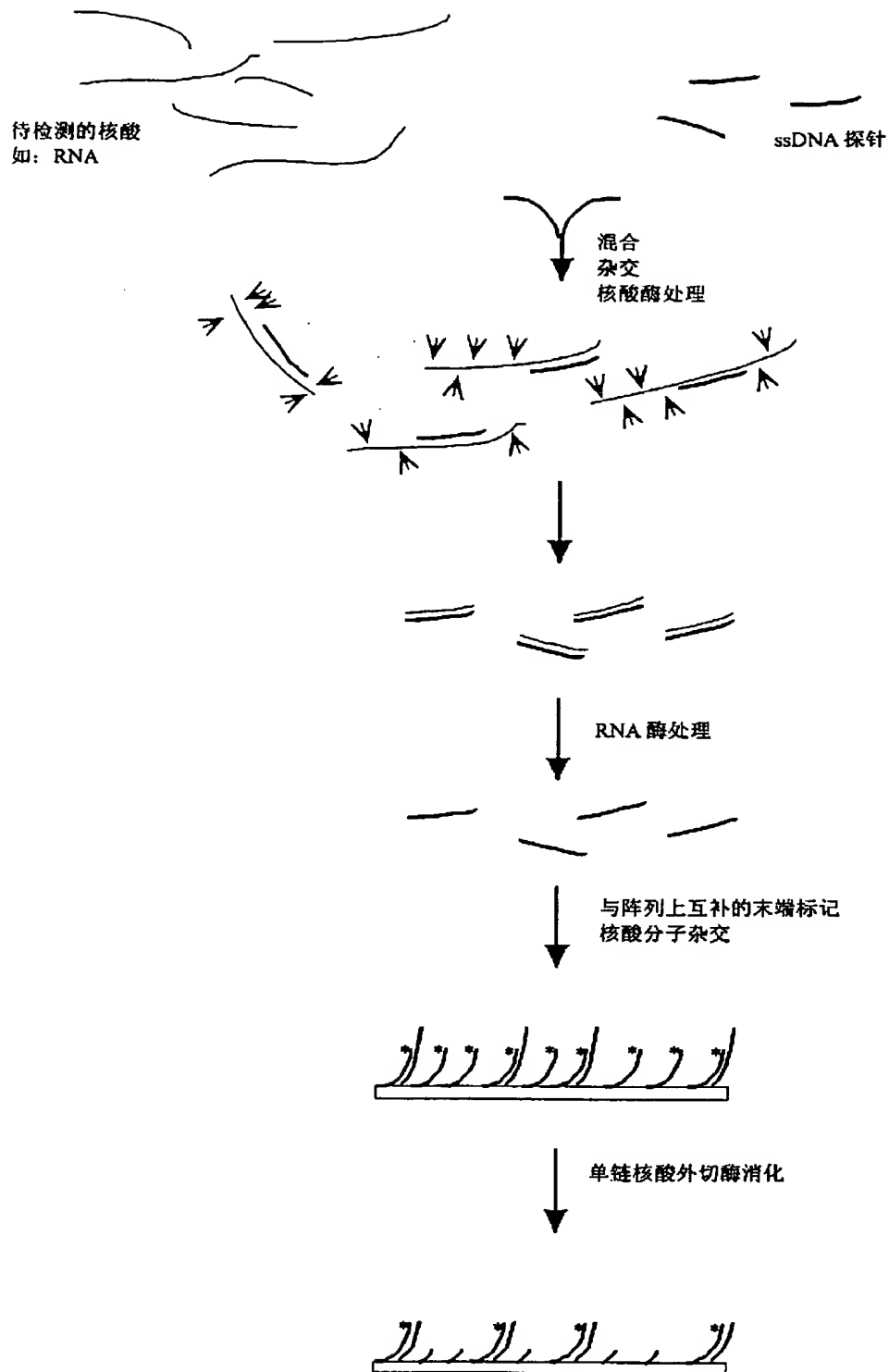


图 5

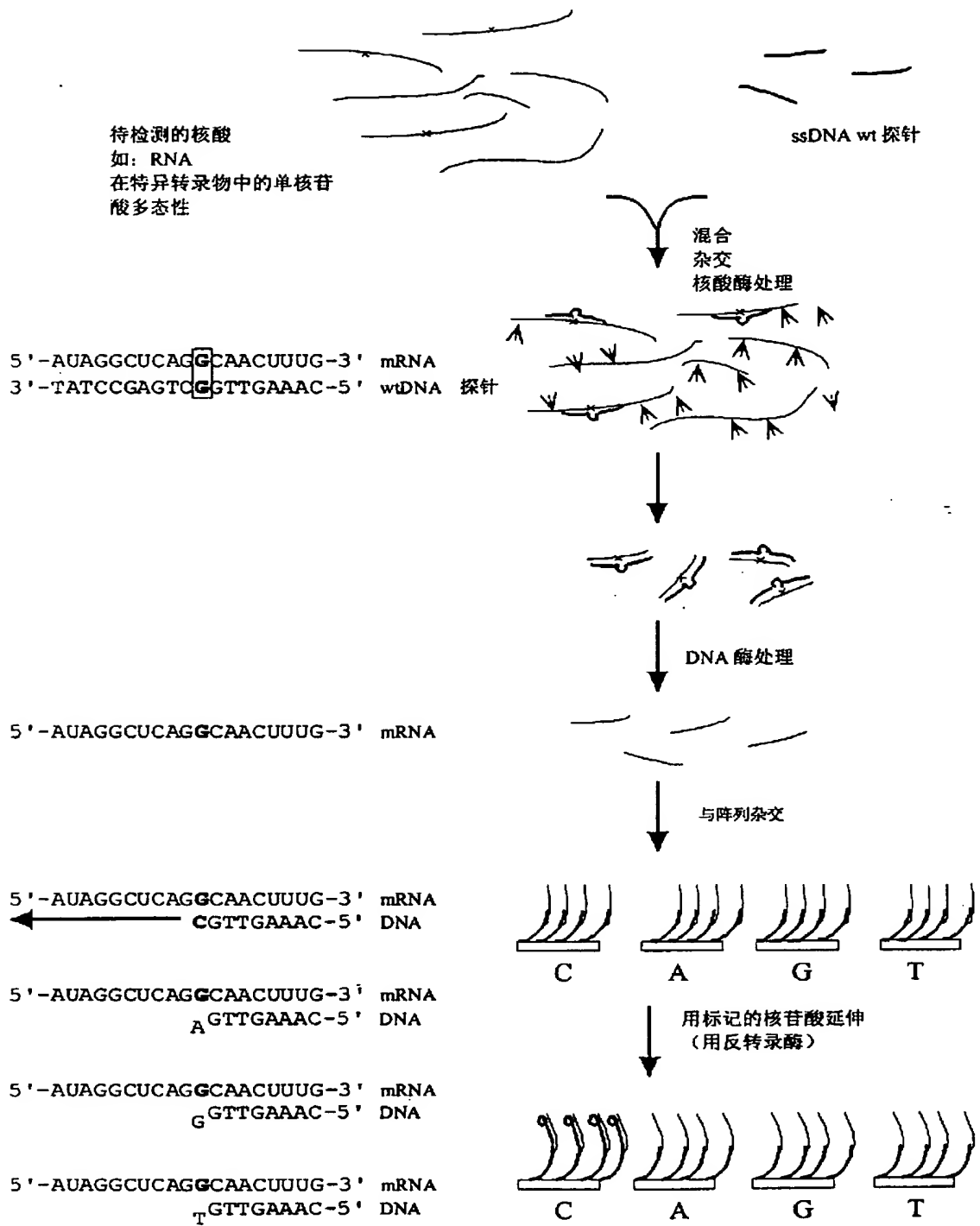


图 6A

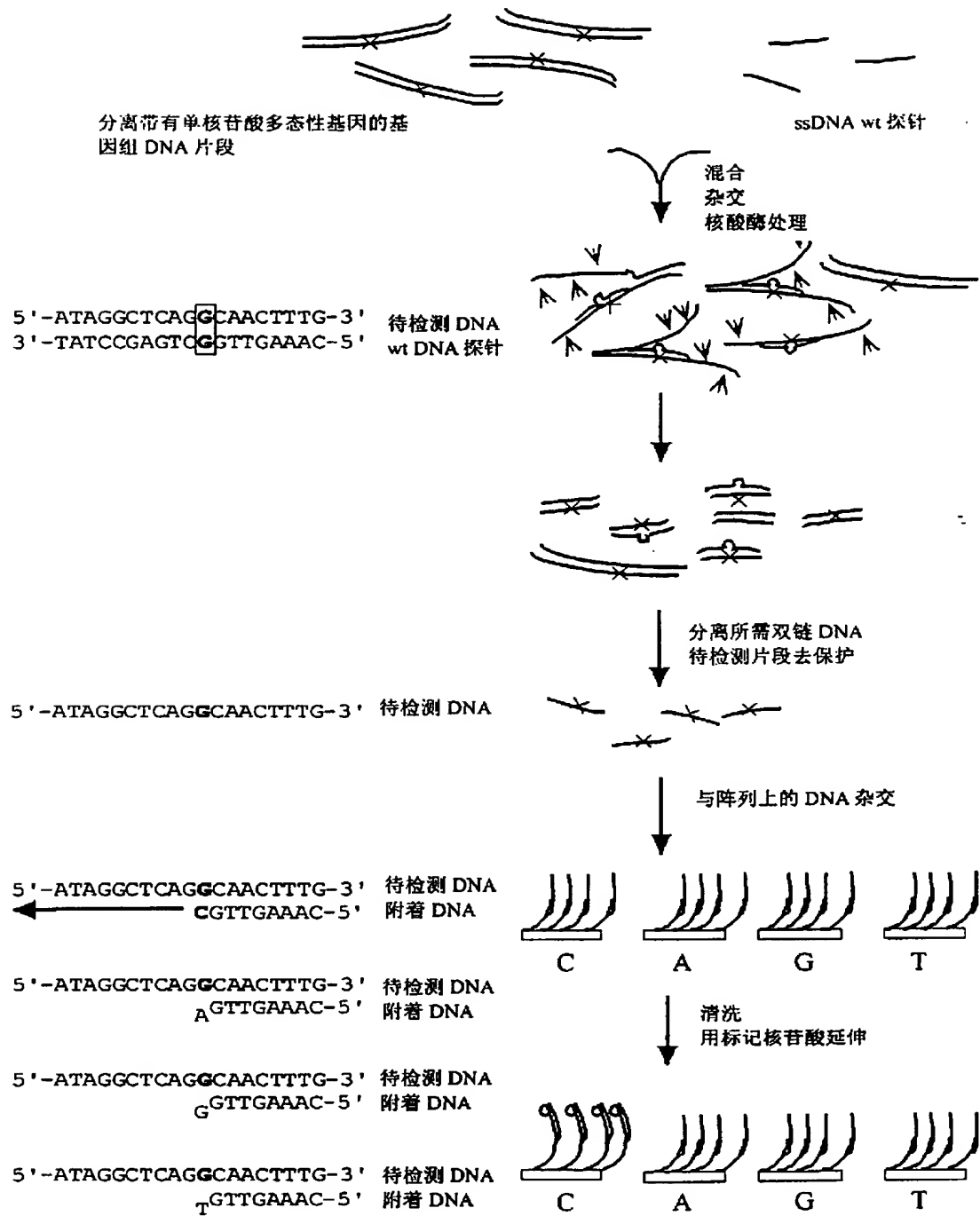


图 6B

00-08-24

74

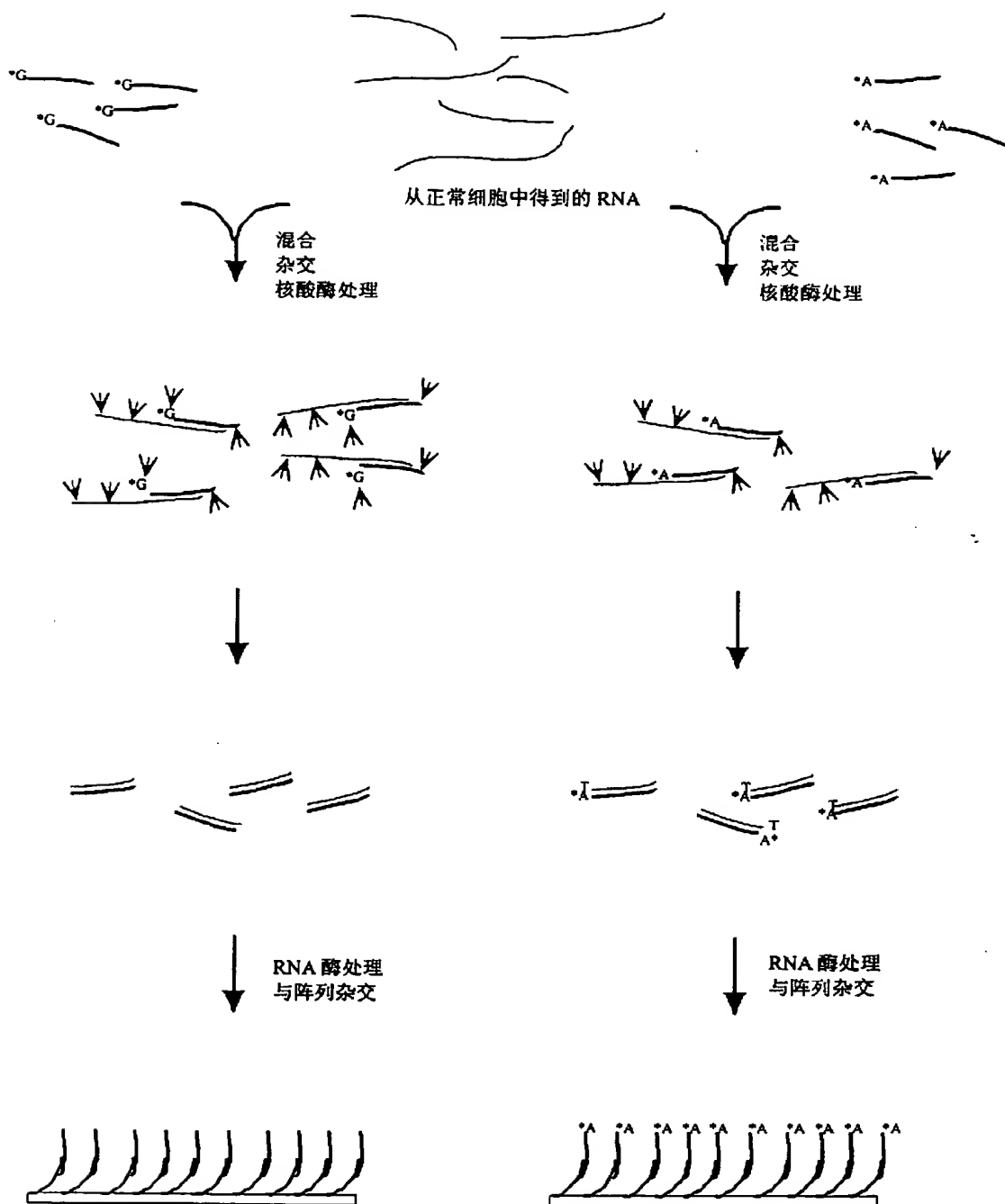


图 7A

00.08.24

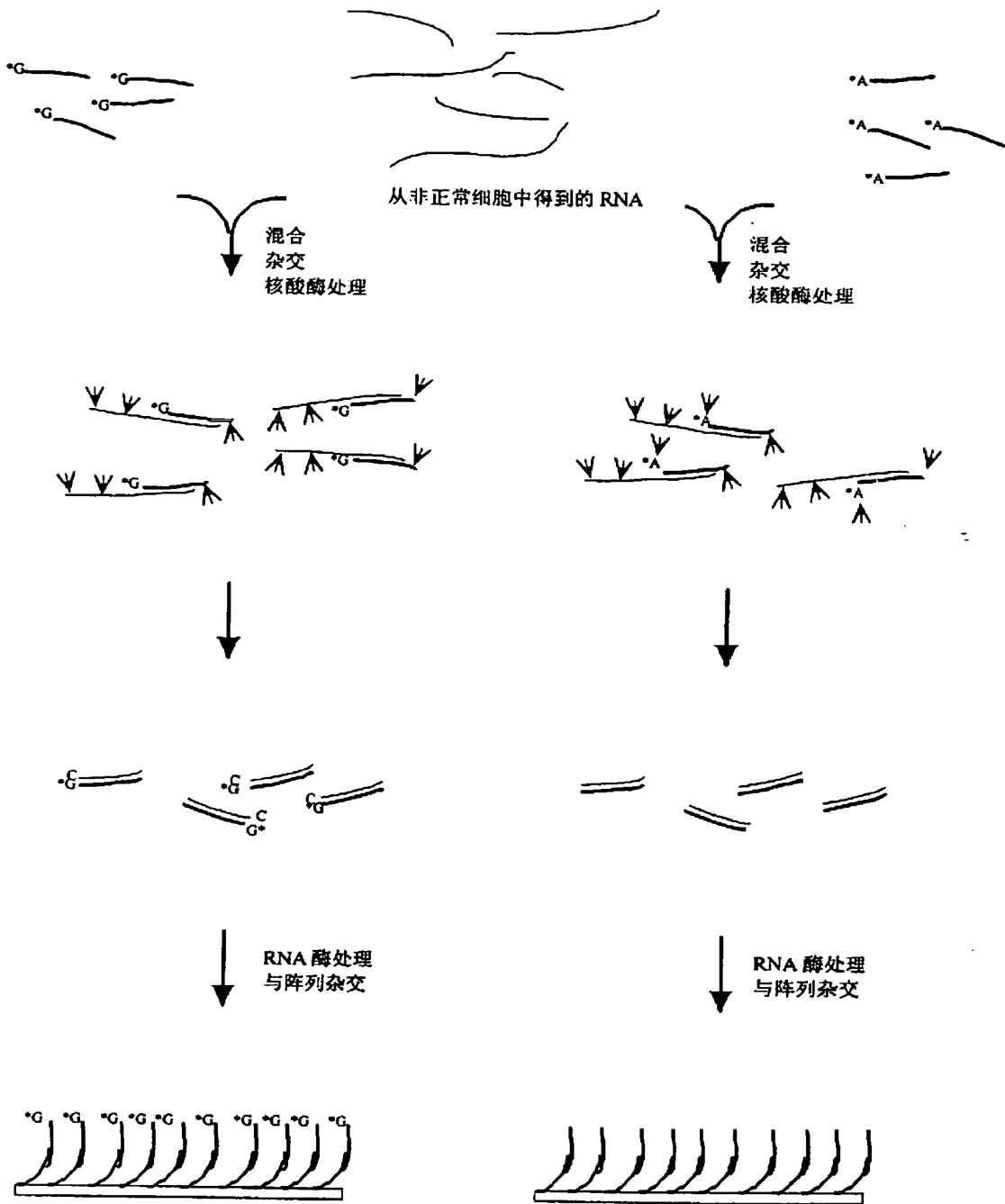


图 7B

待检测的核酸
如: DNA
在特异转录物中的单核苷
酸多态性

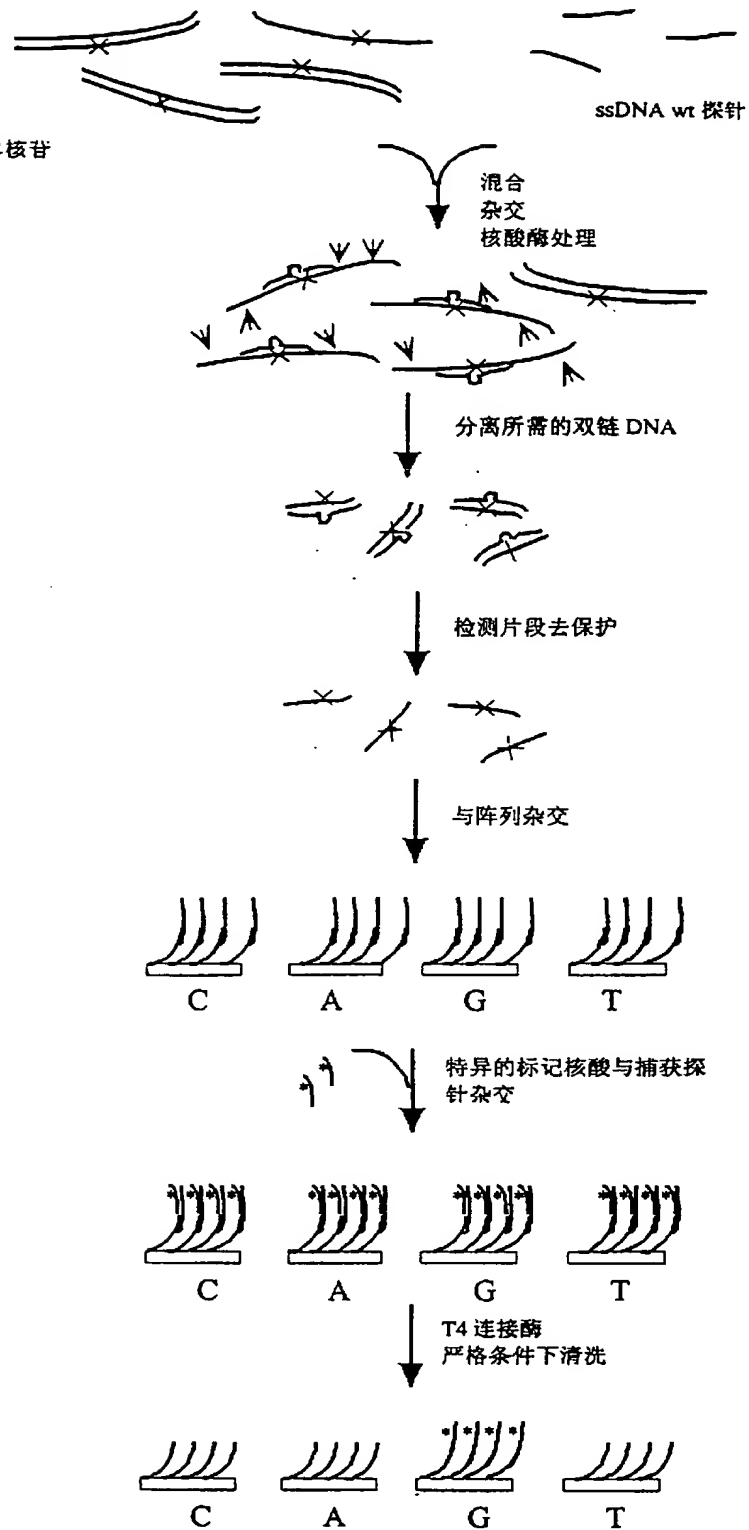


图 8